
Neue molekulare Pinzetten und die Hemmung der Enzyme PARP-1/G6PD

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

vorgelegt von

Constanze Wilch

geboren in Bottrop

Institut für Organische Chemie

der

Universität Duisburg-Essen

Essen 2012

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2009 bis Dezember 2012 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Thomas Schrader am Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Tag der Disputation: 07.03.2013

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Schrader
 Prof. Dr. Gebhard Haberhauer
Vorsitzender: Prof. Dr. Mathias Ulbricht

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Neue molekulare Pinzetten und die Hemmung der Enzyme PARP-1/G6PD“

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe, und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Essen, im Dezember 2012

Constanze Wilch

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Thomas Schrader für die interessante Aufgabenstellung, seine ständige Diskussionsbereitschaft und die mir eingeräumte Freiheit bei der Bearbeitung des Themas.

Herrn Prof. Dr. Gebhard Haberhauer danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Prof. Dr. Mathias Ulbricht danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Für die finanzielle Unterstützung bedanke ich mich bei der Werdelmann-Stiftung für die Zuwendung durch Sachmittel.

Herrn Dr. Michael Kirsch vom Universitätsklinikum Essen danke ich für die Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bei der enzymkinetischen Problemstellung und die Zusammenarbeit im Rahmen der Kooperationsprojekte Glucose-6-phosphat Dehydrogenase und Poly-(ADP-Ribose) Polymerase. Ferner möchte ich mich bei Frau Angela Wensing für die Hilfe bei der Durchführung der enzymkinetischen Untersuchungen der G6PD bedanken.

Frau Dr. Utta Berchner-Pfannschmidt danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung des Electrophoretic Mobility Shift Assay und die ständige Diskussionsbereitschaft und Hilfestellung dieses Teilprojektes. Ferner möchte ich Frau Mareike Müller danken für die gute Unterweisung nicht denaturierende Gele zu gießen. Dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Fandray danke ich für die nette Arbeitsatmosphäre am Klinikum und die Bereitstellung der Laborausrüstung.

Herrn Heinz Bandmann und Herrn Dr. Torsten Schaller danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Aufnahme der NMR-Spektren und für die stetige Diskussionsbereitschaft. Herrn Dr. Torsten Schaller danke ich zudem für die Hilfestellung bei mathematischen Problemen.

Herrn Klaus Kowski danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Lösung von technischen Problemen aller Art und für die Durchführung der ITC. Ferner danke ich ihm für die angenehmen Unterhaltungen außerhalb der Chemie.

Bei Frau Christine Kallweit bedanke ich mich für die Aufnahme der CD-Spektren.

Bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitskreise Schrader und Haberhauer bedanke ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die gegenseitige Unterstützung und

Danksagung

Hilfe bei Problemen jeglicher Art. Ein herzliches Dankeschön gilt auch meinen beiden Auszubildenden Svenja Blaskowski und Timo Kettmann.

Für das Korrekturlesen meiner Arbeit danke ich meinen Arbeitskollegen Marco Hellmert und Christina Tepper.

Ferner danke ich meiner Familie und allen lieben Menschen in meinem Umfeld, die aktiv für die moralische Unterstützung Anteil nahmen.

Teile dieser Arbeit sind publiziert, eingereicht oder auf Kongressen präsentiert worden:

Vortrag: C. Wilch, *Neue Mechanismen der Enzyminhibition durch künstliche Rezeptormoleküle*, 15. Workshop “Mechanismen der Zell- und Gewebeschädigung” in Xanten am Niederrhein, 26.11.-28.11.2009.

S. Dutt, C. Wilch, T. Schrader, Artificial synthetic receptors as regulators of protein activity, *Chem. Com.* **2011**, 47, 5376.

1. Einleitung	1
1.1 Supramolekulare Bindungen	1
1.1.1 Molekulare Pinzetten	2
1.2 Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP-1)	7
1.2.1 PARP-1	7
1.2.2 Bisherige Untersuchungen der Hemmung von PARP-1	10
1.3 Glucose-6-phosphat Dehydrogenase (G6PD)	14
1.3.1 G6PD	14
1.3.2 Bisherige Untersuchungen an der G6PD	17
2. Aufgabenstellung	21
3. Durchführung und Ergebnisse	27
3.1 Methoden	27
3.1.1 Fluoreszenztitrationsen	27
3.1.2 Bindungsexperimente mittels ¹ H-NMR-Titrationsen	27
3.1.3 UV/Vis-Schmelzkurven	29
3.1.4 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	30
3.1.5 Circular-Dichroismus-Spektroskopie	31
3.1.6 Isotherme Mikrokalorimetrie (ITC)	33
3.2 Synthese der Pinzetten	34
3.2.1 Synthese des Grundgerüsts molekularer Pinzetten	34
3.2.2 Synthese der Bisphosphatpinzette	38
3.2.3 Synthese der Carboxymethylpinzette	39
3.2.4 Synthese der unsymmetrischen Pinzetten	40
3.3 Bindungsstudien mit den neuen Pinzetten	46
3.3.1 Untersuchung der Carboxymethylpinzette 24	46
3.3.2 Untersuchungen der Methoxyphosphatpinzette 29	57
3.3.3 Untersuchungen der Carboxymethylphosphatpinzette 34	66
3.4 Untersuchungen an dem Enzym Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP-1)	77
3.4.1 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	77
3.4.2 Kinetikmessungen	83
3.4.3 Untersuchung der Bindung mit Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)	88
3.5 Hemmung der Glucose-6-phosphat Dehydrogenase (G6PD)	89
3.5.1 Bestimmung der IC ₅₀ -Werte	89
3.5.2 Bestimmung der Lineweaver-Burk Plots	90
3.5.3 Inhibitions- und Reaktivierungsexperimente der G6PD	93
3.5.4 Untersuchung der Bindung zwischen der Bisphosphatpinzette und G6PD mittels CD-Spektroskopie	94
3.5.5 Untersuchung mittels Isothermer Titrationskalorimetrie (ITC)	97

4. Zusammenfassung und Ausblick	99
4.1 Zusammenfassung	99
4.2 Ausblick.....	104
5. Experimenteller Teil.....	109
5.1 Chemikalien und Methoden	109
5.1.1 Chemikalien.....	109
5.1.2 Lösungsmittel	109
5.1.3 Chromatographie	109
5.1.4 Schmelzpunktbestimmung.....	110
5.1.5 Infrarotspektroskopie	110
5.1.6 UV/Vis-Spektroskopie.....	110
5.1.7 Fluoreszenz-Spektroskopie.....	110
5.1.8 Massenspektroskopie	110
5.1.9 Magnetische Kernresonanzspektroskopie (NMR).....	110
5.1.10 CD-Spektren	111
5.1.11 Isotherme Mikrokalorimetrie (ITC).....	111
5.1.12 Verwendete Puffer	111
5.2 Synthesen.....	113
5.2.1 Synthese des Natriumsalzes der Bisphosphatpinzette	113
5.2.2 Synthese des Natriumsalzes der Carboxymethylpinzette	117
5.2.3 Synthese der Monophosphatpinzette	123
5.2.4 Synthese eines Glycollinkers	127
5.2.5 Synthesen der unsymmetrischen Pinzetten.....	130
5.2.6 Synthese von substituierten Phosphat-Modellverbindungen.....	149
5.3 Untersuchungen an Enzymen	153
5.3.1 Generierung der DNA-Doppelstränge.....	153
5.3.2 DNA-Schmelzkurven	154
5.3.3 Untersuchung der Inhibition von PARP-1 mittels Electrophoretic Mobility Shift Assay.....	157
5.3.4 Lineweaver-Burk Plots von PARP-1 mit variabler Pinzetten-Konzentration	160
5.3.5 Untersuchung der Hemmung von G6PD mittels CD-Spektroskopie	163
5.4 Bestimmung der Assoziationskonstanten K_a	164
5.4.1 Bestimmung der Assoziationskonstanten K_a mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektroskopie	164
5.4.2 Bestimmung der Assoziationskonstanten K_a durch Fluoreszenztitrationen	171
5.4.3 Bestimmung der Assoziationskonstanten mittels Isothermer Mikrokalorimetrie (ITC).....	202
6. Literaturverzeichnis	207

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
abs.	absolut
Ac-Arg-OMe	<i>N</i> -Acetylargininmethylesterhydrochlorid
Ac-Lys-OMe	<i>N</i> -Acetyllysinmethylesterhydrochlorid
ADH	Alkoholdehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AMD	Automodifikationsdomäne
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
ATP	Adenosintriphosphat
ber.	berechnet
Bn	Benzyl-
BP	Basenpaare
BRCT	breast cancer carboxy-terminale Domäne
C	Cystein
CD	Circulardichroismus
CH	Cyclohexan
DBD	DNA-bindende Domäne
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DDQ	2,3-Dicyano-5,6-dichloro- <i>p</i> -benzochinon
DHEA	Dehydropiandrosteron

Abkürzungsverzeichnis

DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EE	Essigsäureethylester (Ethylacetat)
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
EPS	elektrostatische Potentialoberfläche
eq.	Äquivalent(e)
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
ESI	Elektronenspray-Ionisation
et al.	und andere (lat. et alia)
FI	Fluoreszenzintensität
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid
GTP	Guanosintriphosphat
G6P	Glucose-6-phosphat
G6PD	Glucose-6-phosphat Dehydrogenase
HRMS	Hochaufgelöste Massenspektroskopie
HTH	Helix-Turn-Helix
Hz	Hertz
I	Intensität

Abkürzungsverzeichnis

IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IR	Infrarotspektroskopie
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
k	Kilo
kat.	katalytisch
Lys	Lysin
M	Molar (mol/L)
max	maximum
MD	Moleküldynamik
Me	Methyl
MEK	Kinase (phosphoryliert ERK)
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
mM	Millimolar (mM/L), 10 ⁻³ M
μM	Mikromolar (μM/L), 10 ⁻⁶ M
NAD ⁺	Nikotinamidadeninukleotid
NADP ⁺	Nikotinamidadeninukleotid Phosphat
neg.	negativ
NEt ₃	Triethylamin
<i>n</i> H	<i>n</i> -Hexan
NLS	Nuclear Localisation Signal (Kernlokalisationssignal)
nm	Nanometer
nM	Nanomolar (nM/L), 10 ⁻⁹ M

Abkürzungsverzeichnis

NMNA	<i>N</i> -Methylnikotinamidiodid
NMR	Kernresonanzspektroskopie
ns	Nanosekunde(n)
OD	Optische Dichte
pa.	per analysis
PARP-1	Poly-(ADP-Ribose) Polymerase 1
PDB	Proteindatenbank
pos.	positiv
ppm	parts per million
p53	humaner Tumorsuppressor
Raf	Proteinkinase (rapidly accelerated fibrosarcoma)
Ras	Proto-Onkogen (<i>Rat sarcoma</i>)
RT	Raumtemperatur
Schmp.	Schmelzpunkt
T	Thymin
TBE	TRIS-Borat-EDTA (Puffer)
TEMED	Tetramethyldiamid
THF	Tetrahydrofuran
TMSBr	Trimethylsilylbromid
Tos	Tosyl-
TsCl	Tosylchlorid
U	Unit
UV	Ultraviolett

Abkürzungsverzeichnis

Vis sichtbar (visible)

Zers. Zersetzung

1. Einleitung

1.1 Supramolekulare Bindungen

Neben der kovalenten und der koordinativen Bindung gibt es noch eine Reihe weiterer, sogenannter schwacher oder nichtkovalenter Bindungen. Zu diesen zählen ionische Wechselwirkungen, elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, Kation- π -, Anionen- π -, sowie π - π -Wechselwirkungen, und hydrophobe Wechselwirkungen.^[1]

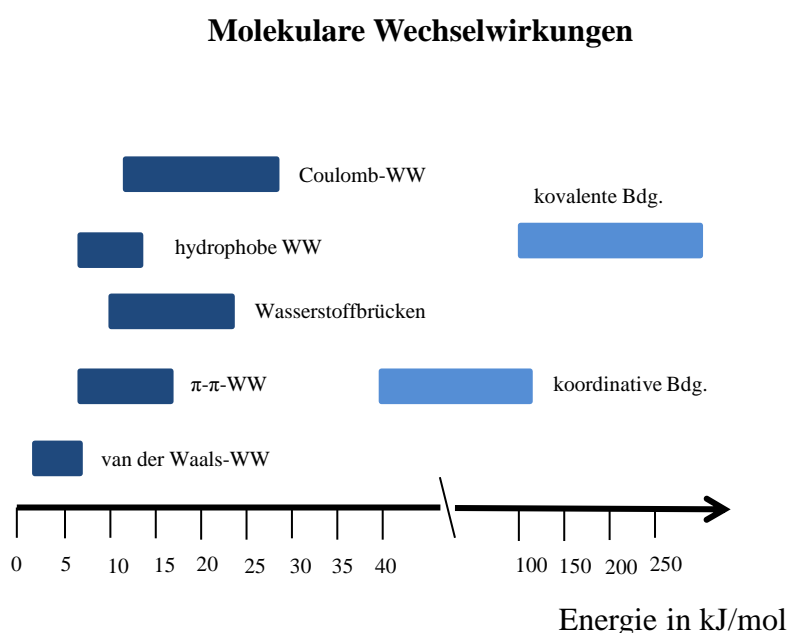


Abbildung 1.1.1: Molekulare Wechselwirkungen und ihre Energiebeträge.

Für eine mit einer kovalenten Bindung vergleichbaren Stabilität muss eine große Anzahl von schwachen Wechselwirkungen vorliegen. Der Vorteil dieser nicht kovalenten Bindungen ist, dass sie reversibel sind und somit dynamische Vorgänge ermöglicht werden. Die Wasserstoffbrückenbindungen haben von den nicht kovalenten Bindungen eine große Bedeutung. So sind sie ausschlaggebend bei der Ausbildung der DNA-Doppelhelixstruktur und bei Enzym-Substrat-Komplexen. Diese natürlichen Erkennungsprozesse versucht die supramolekulare Chemie zu kopieren.^[2] Um die nicht kovalenten Wechselwirkungen genauer zu verstehen wurde bereits eine Vielzahl an künstlichen Rezeptoren entwickelt und untersucht. Entscheidend für die Bindungsstärke eines Rezeptors sind dabei neben den auszubildenden Wechselwirkungen auch die Größe, Form und deren Präorganisation.^[3]

Moleküle, die als gute präorganisatorische Rezeptoren gelten, sind z.B. Kronenether, Kryptanden, Cyclodextrine, Cyclophane, Cucurbiturile und Kryptophane.^[4-15] Zusätzlich müssen sich die Bindungspartner ähnlich wie bei der Enzym-Substrat-Bindung einem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“, bzw. ihrer Erweiterung „induced fit“ erkennen.^[16] Die Stabilität des Komplexes wird dabei stark von der Anzahl der herrschenden Bindungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen, π - π -Stapel- und Kation- π -Wechselwirkungen, beeinflusst.^[17-28] Durch den Einsatz der Proteindatenbank beim Molecular Modeling konnten bereits einige Moleküle entwickelt werden, die die Bindungsstelle der Enzyme besetzen und dadurch diese inhibieren.^[29-33]

1.1.1 Molekulare Pinzetten

In der supramolekularen Chemie besitzt die Entwicklung molekularer Systeme, wie die molekularen Klammern und Pinzetten, die auf molekularer Ebene Bewegungen kontrollieren, ein wachsendes Interesse. Diese Systeme charakterisieren sich durch eine offene Kavität, in der Gäste durch verschiedene supramolekulare Wechselwirkungen gebunden werden können. Die erste molekulare Pinzette wurde von *Whitlock* und *Chen* entwickelt und ist aus zwei sandwichartigen aromatischen Systemen aufgebaut, die über einen rigiden Spacer miteinander verknüpft sind. *Whitlock* und *Chen* beschreiben ihre flexible molekulare Pinzette als ein Molekül, das aus zwei Koffein-Einheiten besteht, die über einen Alkin-Spacer verbunden sind (Verbindung **1E**). Dieses ist nun in der Lage durch π - π - und Ionen-Dipol-Wechselwirkungen in ihrer Kavität das Substrat 1,3-Dihydroxynaphthalin-2-carbonsäure (**2E**) zu binden.^[34]

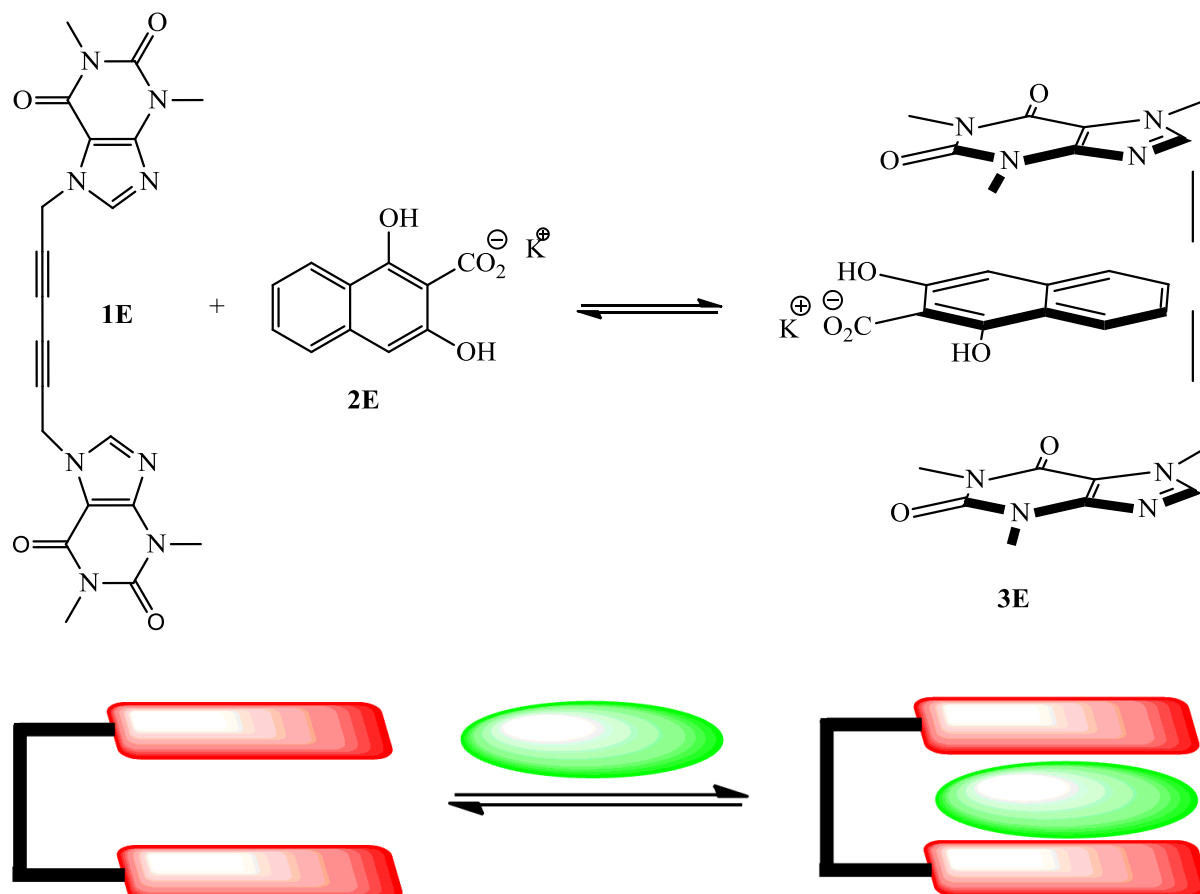


Abbildung 1.1.1.1: Die erste molekulare Pinzette und das Prinzip der supramolekularen Erkennung.

Zimmermann et al. entwickelten molekulare Pinzetten, die einen hohen Grad der Präorganisation aufweisen, in dem der Spacer die Bindungsarme in einer *syn*-Konformation hält.^[35,36] Diese Pinzetten mit Acridin-, Anthracen- oder Phenanthren-Seitenwänden bilden in Gegenwart von elektronenarmen polycyclischen Nitroaromaten stabile Komplexe. Die von *Zimmermann et al.* entwickelte Dibenz[*c,h*]acridin-basierte molekulare Pinzette **4E** besitzt eine hohe Affinität für 9-Adenin **5E**. Die Säure-Gruppe der Pinzette spielt bei der Komplexierung durch die Wasserstoffbrückenbindung eine große Rolle. So findet bei Abwesenheit dieser Gruppe keine Komplexierung statt.^[37,38] Die Bindung des Gastes erfolgt nur über Wasserstoffbrückenbindungen, die durch π - π -Stapelwechselwirkungen verstärkt wird.

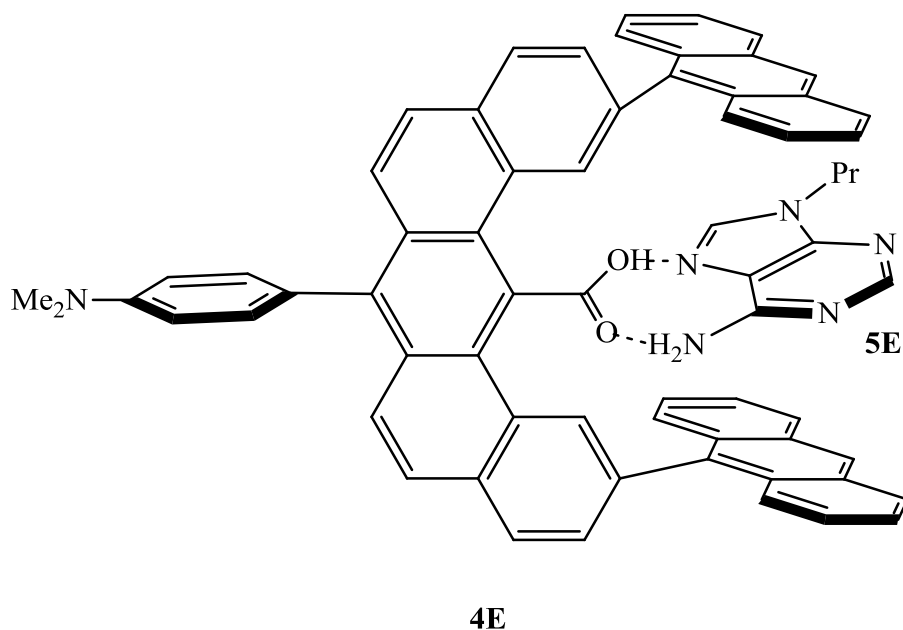


Abbildung 1.1.1.2: Bindung der Zimmermann Pinzette **4E**.

Diese molekularen Pinzetten sind alle in der Lage durch Rotation der Seitenarme die Form der Kavität zu verändern. Eine andere Familie der molekularen Pinzetten wurde von *Klärner et al.* entwickelt, die eine hohe rigide Polyaren-Architektur aufweist.

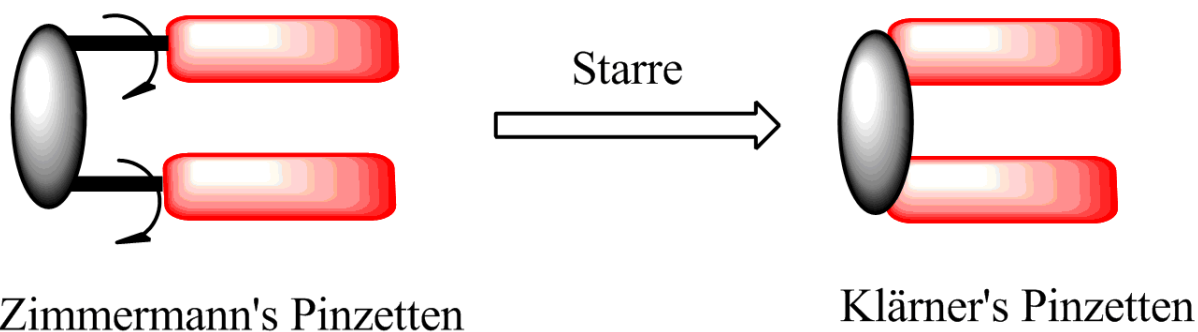


Abbildung 1.1.1.3: Zwei Familien der molekularen Pinzetten mit unterschiedlicher Starre der Seitenwände.

Diese Pinzetten besitzen eine gleichbleibende Kavitätengröße, die von der jeweiligen Größe und Art der Spacereinheit abhängt.

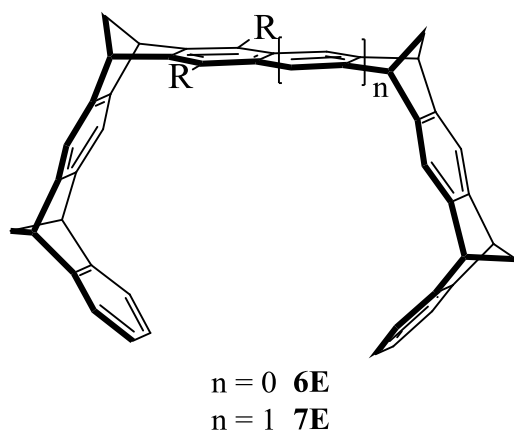


Abbildung 1.1.1.4: Molekulare Pinzette nach Klärner.

Diese von *Benkhoff* synthetisierten Pinzetten sind aus Norbornadien-, Benzol- und Naphthalineinheiten aufgebaut und sind nach unten hin geöffnet.^[39,40] Basierend auf diesen Arbeiten ist es *Kamieth* und *Burkert* gelungen Benzolpinzetten darzustellen, die in der Lage sind, elektronenarme aliphatische Moleküle in ihrer Kavität zu binden.^[41-43] Berechnungen der elektrostatischen Potentialoberfläche (EPS) mittels quantenmechanischer Rechenmethoden (AM1, DFT, ab initio) zeigen eine Selektivität der Pinzetten gegenüber elektronenarmen Gästen.^[44-46] Die konkave Seite der Pinzetten besitzt ein hohes negatives Potential (hohe Elektronendichte), währenddessen die Substrate eine geringe Elektronendichte aufweisen. Zwischen Wirt und Gast besteht somit eine ausgeprägte Komplementarität der elektrostatischen Potentiale. Durch die hohe Elektronendichte der Kavität eignet sich die Pinzette gut für elektronenarme aliphatische Gäste. Die Bindung erfolgt dabei durch nicht kovalente Wechselwirkungen wie z.B. Kation- π - und CH_2 - π -Wechselwirkungen.^[47-49]

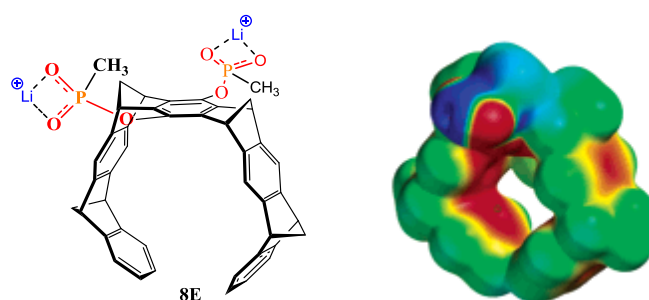


Abbildung 1.1.1.5: Wasserlösliche Bisphosphonatpinzette und ihr elektrostatisches Oberflächenpotential EPS, ermittelt mit PM3. Rot zeigt dabei hohe Elektronendichte in der Pinzettenkavität.^[50]

In Zusammenarbeit mit *Klärner* entwickelte *Schrader* eine wasserlösliche Pinzette, die in der Lage ist selektiv Arginin und Lysin in Wasser zu binden. Diese Pinzette besteht aus neun

annelierten Ringen mit einer zentralen Hydrochinoneinheit, an der substituierte Phosphonateinheiten die nötige Wasserlöslichkeit gewährleisten. Arginin und Lysin werden in der Kavität gebunden, in dem die Ammonium-, bzw. Guanidiniumgruppe der Seitenkette eine Salzbrücke zum Phosphonation ausbildet.^[50-53]

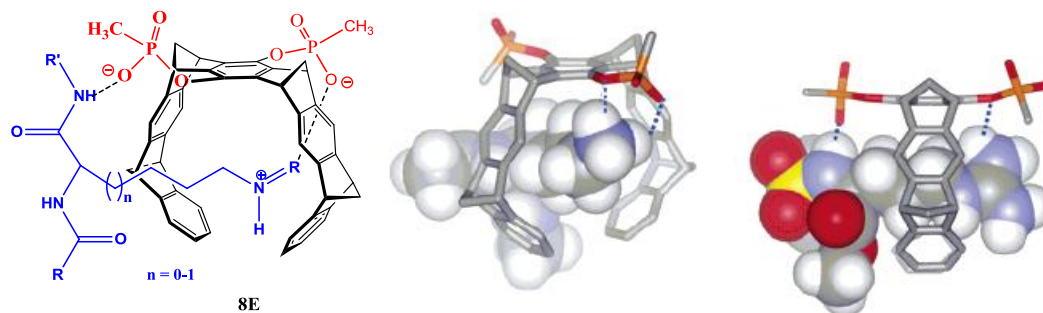


Abbildung 1.1.1.6: Links: Bindung der Aminosäure in der Kavität. Mittig: Monte-Carlo Simulation der Pinzette mit Ac-Lys-OMe. Rechts: Monte-Carlo Simulation der Pinzette mit Ts-Arg-OMe.^[50]

In wässriger Lösung erhält man für Ac-Lys-OMe eine Assoziationskonstante von $K_a = 23000 \text{ M}^{-1}$ und in gepufferter Lösung bei $pH = 7.0$ von 4400 M^{-1} . Das Argininderivat wird etwas schwächer mit 7800 M^{-1} in wässriger Lösung und 1800 M^{-1} in gepufferter Lösung gebunden. Bis auf das sehr schwach gebundene Histidin wird keine weitere Aminosäure in der Kavität komplexiert. Durch die Einführung von Phosphatsubstituenten und die Überführung in die entsprechenden Lithium-, bzw. Natriumsalze konnte durch *Bastkowski* die Wasserlöslichkeit und auch die Bindungsaffinität gegenüber Lysin und Arginin deutlich erhöht werden.^[54] So wurde für die Phosphatpinzette in wässriger gepufferter Lösung eine Bindungskonstante von $K_a = 57000 \text{ M}^{-1}$ für Ac-Lys-OMe ermittelt. Diese molekularen Phosphatpinzetten wurden durch *Talbiersky* in Bezug auf Enzymhemmung untersucht.^[55,56]

1.2 Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP-1)

1.2.1 PARP-1

Die Poly(ADP-Ribosyl)ierung ist eine reversible posttranslatorische Modifikation von nuklearen Proteinen mit Glutamat-, Aspartat- und Lysin-Resten, die an der Regulation von basalen zellulären Prozessen einen wichtigen Anteil hat. Sie spielt z.B. eine wichtige Rolle bei der Detektion und Reparatur von DNA-Schäden und dem kontrollierten Zelltod (Apoptose). Sie wurde 1963 vom *Chambon et al.* Entdeckt und wird katalysiert durch die Enzymfamilie der Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen (PARP). Diese Enzymfamilie umfasst nach heutigem Kenntnisstand 18 Mitglieder, die alle die gleiche minimale katalytische Domäne aufweisen und alle die Übertragung von ADP-Ribose Einheiten (ADPr) von Nikotinamid-Dinukleotiden (NAD) katalysieren.^[57] Dabei entsteht eine hohe Komplexität mit bis zu 200 Einheiten und verschiedenen Verzweigungsstellen. Der größte Anteil an der PARP-Familie hat mit etwa 90% das nukleäre Protein PARP-1. PARP-1 ist ein 113 kDa großes und 1014 Aminosäuren langes NAD⁺-katabolisierendes Metalloenzym, das eine zentrale Rolle bei der DNA-Reparatur besitzt und mit 10⁶ Molekülen pro Zelle vorkommt.^[58] PARP-1 lässt sich in drei Domänen unterteilen: In die 46 kDa große N-terminale DNA-bindende Domäne (DBD) mit zwei Zinkfingermotiven, in die zentrale 22 kDa große basische Automodifikationsdomäne (AMD) und in die C-terminale katalytische Domäne.^[59-64]

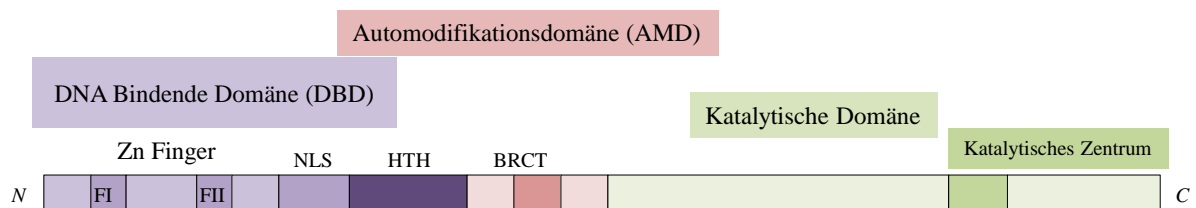


Abbildung 1.2.1.1: PARP-1 mit seinen funktionellen Domänen.

Die DNA-bindende Domäne besitzt neben den beiden Zinkfingermotiven eine bipartite Kernlokalisationssequenz (NLS: nuclear localisation signal), eine Schnittstelle für die apoptotischen Enzyme Caspase 3 und Caspase 7, sowie zwei Helix-turn-helix-Domänen (HTH). Neben den beiden Zinkfingermotiven sind auch die beiden HTH-Domänen an den DNA-Bindungen beteiligt.^[65] In den beiden Zinkfingermotiven werden Zinkionen durch drei Cystein- und einem Histidin-Rest komplexiert und sind im Vergleich zu anderen Zinkfingerproteinen durch die Größe von 28 bzw. 30 Aminosäuren sehr große Zinkfinger, wie

sie nur noch in Ligase III vorkommen.^[63,66] Die beiden Zinkfinger motive sind essentiell für die katalytische Funktion von PARP-1 bei DNA-Strangbrüchen. Das Zinkfingermotiv I bindet bei Doppel- wie auch Einzelstrangbrüchen, das Zinkfingermotiv II bindet hingegen nur DNA mit Einzelstrangbrüchen.^[67] Durch die Wechselwirkungen der HTH-Domäne ist es auch möglich ungeschädigte DNA zu binden. Die Aktivierung von PARP-1 durch Einzelstrangbrüche ist wesentlich wichtiger als die Aktivierung durch Doppelstrangbrüche. Die Bindung erfolgt dabei elektrostatisch an den DNA-Enden. PARP-1 bedeckt ein Gebiet von 7 Nukleotiden auf jeder Seite des Einzelstrangbruchs, so dass ein symmetrischer Einschluss vorliegt, der die DNA stabilisiert.

An der Automodifikationsdomäne poly(ADP-ribosyl)iert sich PARP-1 an den Glutamatresten selbst. Das in der AMD liegende BRCT Bindungsmotiv übt starke und spezifische Wechselwirkungen mit anderen Proteinen, wie z.B. XRCC1 oder der DNA-Ligase III aus. Diese Wechselwirkungen sind verantwortlich für die Bildung des DNA-Base-Excision-Repair (BER) spezifischen Protein-Komplexes.^[59,64]

In der C-terminalen katalytischen Domäne befindet sich die NAD⁺-bindende Domäne. Dort wird die eigentliche PARP-Reaktion katalysiert. Der Cofaktor NAD⁺ wird dort in Nikotinamid und ADP-Ribose gespalten, letzteres wird dann zu Polymeren aufgebaut.^[68]

Die Domänen arbeiten eng miteinander, so steigert sich die basale Aktivität des katalytischen Zentrums um das 500-fache, sobald die beiden Zinkfinger motive DNA-Strangbuchstellen detektieren und markieren.^[59,69]

Das Ausmaß der DNA-Schäden entscheidet darüber, ob PARP-1 das Überleben der Zelle fördert oder den Zelltod induziert. Bei geringen DNA-Schäden unterstützt PARP-1 durch die Förderung des p53-vermittelten Zellzyklusarrests das Überleben der Zelle. Bei massiven DNA-Schäden kommt es zu einer Überaktivierung von PARP-1 mit unkontrollierter Poly-(ADP-Ribosyl)ierung. Die Folge dessen ist die Abnahme des zellulären Adenintriphosphat (ATP) und NAD⁺-Speichers und der nekrotische Zelltod. Das Schema des Janus-Gesichtes zeigt den Hergang.^[64,70,71]

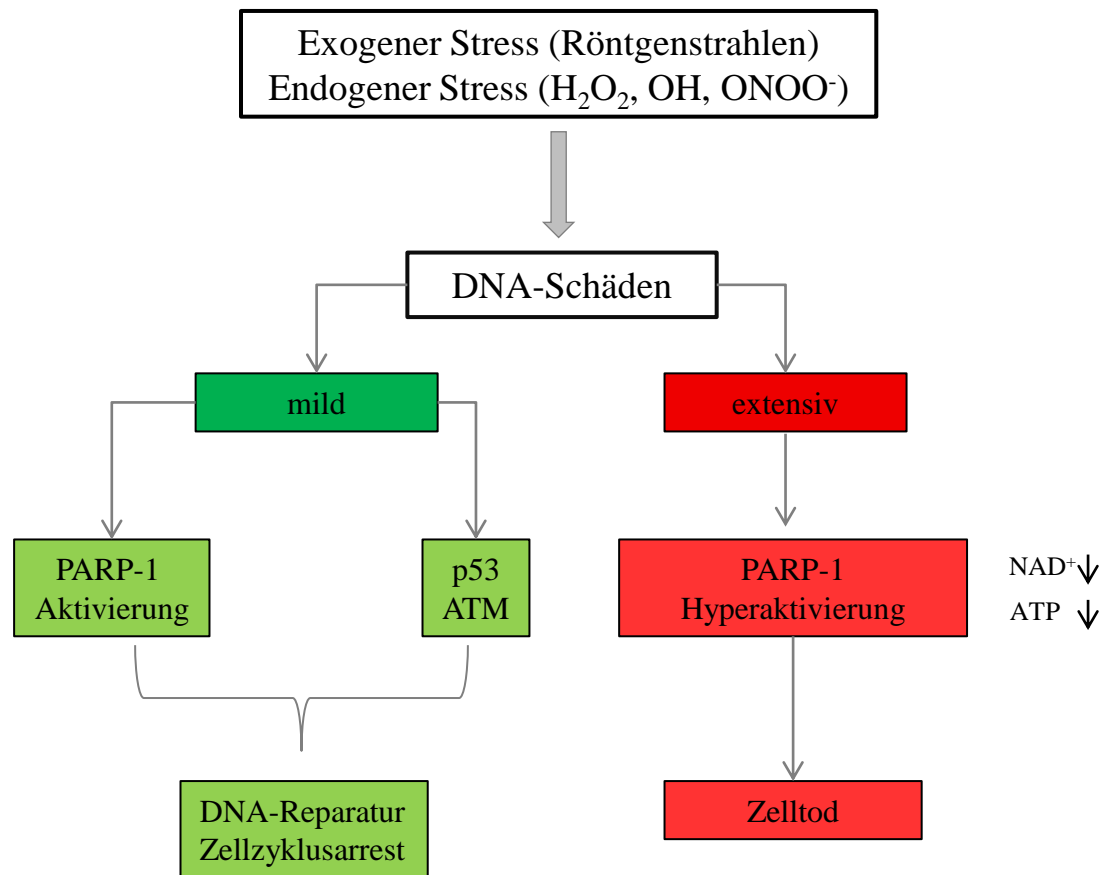


Abbildung 1.2.1.2: „Janus-Gesicht“ von PARP-1.

NAD^+ als essentieller Bestandteil des Energiemetabolismus hat in unbeschädigten Zellen eine Konzentration von ca. 400-500 μM . Bei Zellen mit DNA-Schäden verringert sich die Konzentration in wenigen Minuten um 80%. Es folgt eine Kettenreaktion, bei der die glykolytische Substratphosphorylierung durch die Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) gehemmt wird.

Bei einer Hemmung von PARP-1 bliebe der zelluläre Energiespeicher erhalten und es erfolgte statt einer Nekrose eine Apoptose. Die Apoptose ist der programmierte Tod einer Zelle, die aktiv durchgeführt wird und Teil des Stoffwechsels der Zelle ist. Bei einer Nekrose wird die Zellmembran so geschädigt, dass das Zellinnere ausläuft. Durch diesen Vorgang werden Entzündungsreaktionen hervorgerufen, die zu einer Schädigung benachbarte Zellen und Organe führt.^[72]

1.2.2 Bisherige Untersuchungen der Hemmung von PARP-1

Die bisher eingesetzten PARP-1 Inhibitoren fungieren als Substrat-Mimetika, die die Wechselwirkungen des Substrats NAD^+ mit dem Enzym PARP-1 nachahmen. Sie besitzen alle einen strukturell ähnlichen Aufbau und fungieren somit als kompetitive Inhibitoren, indem sie dem Substrat den Zugang zu der katalytischen Domäne des Enzyms blockieren. Bei der Entwicklung neuer PARP-1 Inhibitoren müssen folgende Merkmale gewährleistet sein.^[64,73]

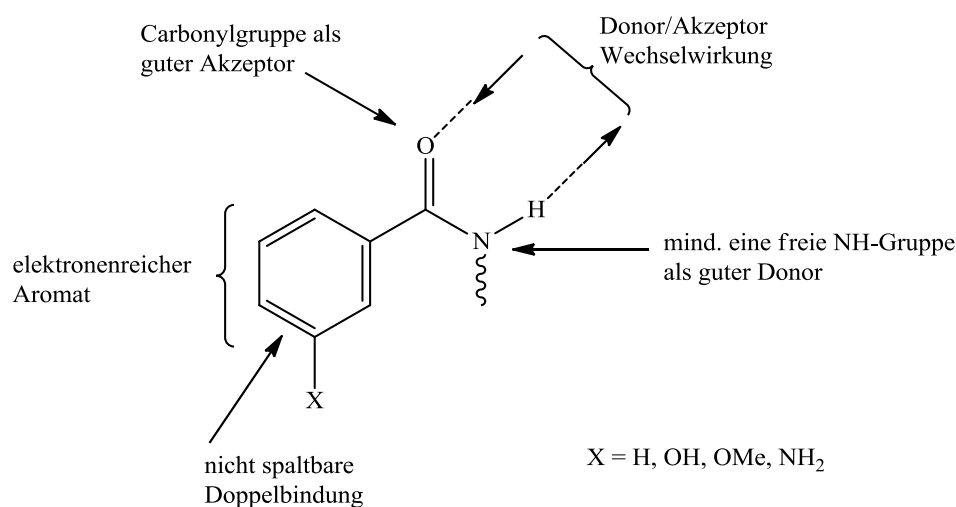


Abbildung 1.2.2.1: Strukturell wichtige Merkmale von PARP-1 Inhibitoren.

Ferner konnte ein Inhibitor entwickelt werden, der in der Lage ist durch Oxidation das Zinkion des FI-Zinkfingers freizusetzen und somit PARP-1 zu inhibieren. Es handelt sich dabei um ein C-Nitrosoderivat (Abbildung 1.2.2.2), das 4-Iodo-3-nitrobenzamid (Iniparib), das auch zur Behandlung von Krebs und AIDS untersucht wird.^[64,74-76]

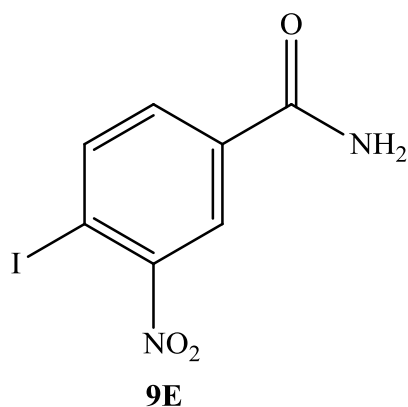


Abbildung 1.2.2.2: Strukturformel des PARP-1 Inhibitors Iniparib.

Durch die PARP-1 Inhibierung wird die Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber der Wirkung von Chemotherapeutika deutlich erhöht. Aus diesem Grunde werden PARP-1 Inhibitoren als Sensibilisatoren und nicht als eigens wirkenden Agens eingesetzt. Die genaue Kombination der Inhibitoren und Therapeutika muss in klinischen Testreihen ermittelt werden, um die optimale Wirksamkeit zu erzielen.

Da bereits die Wirksamkeit der Phosphatpinzette als Inhibitor der Alkohol Dehydrogenase (ADH) bekannt war, wurde die inhibitorische Fähigkeit an dem Monoreaktanden PARP-1 untersucht. Es ist im Gegensatz zu der ADH ein NAD^+ -unabhängiges Enzym. PARP-1 benötigt NAD^+ nicht als Cofaktor, sondern als Substrat. Da die Pinzette nicht wie die üblichen PARP-1 Inhibitoren als Substratmimetikum agieren kann, würde ein für PARP-1 unbekannter Hemmmechanismus vorliegen.

Zunächst wurden dafür IC_{50} -Werte (IC_{50} : mittlere inhibitorische Konzentration) mit einem käuflichen PARP-1-Assay-Kit der Firma Trevigen[®] untersucht und im Anschluss mit den Werten aus dem Assay nach *Putt* und *Hergenrother* verglichen. Die mittlere inhibitorische Konzentration bezeichnet die Konzentration eines Inhibitors bei der eine halbmaximale Inhibition beobachtet wird.

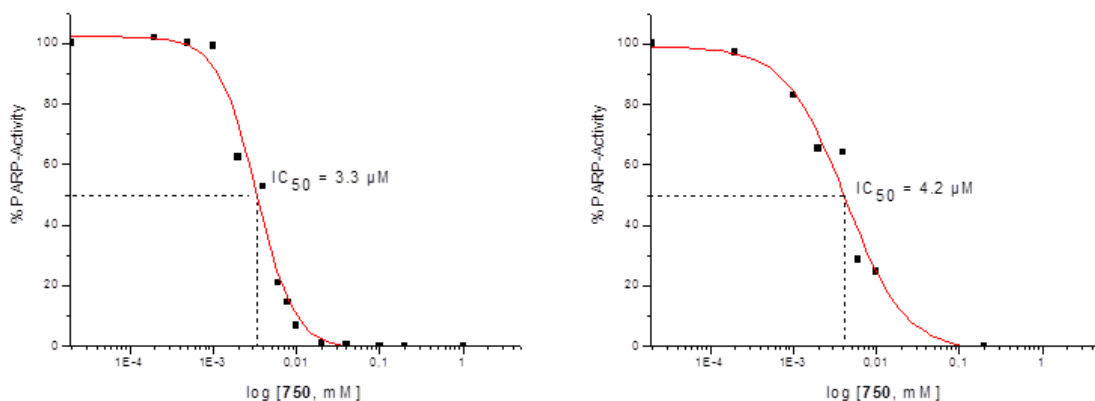


Abbildung 1.2.2.3: IC_{50} -Kurven der Phosphatpinzette nach der Methode von Trevigen[®] (links) und nach *Putt* und *Hergenrother* (rechts).^[56]

Es wurde im Mittel ein IC_{50} -Wert von $3.8 \mu\text{M}$ für die Phosphatpinzette gefunden. Folglich eignet sich die Phosphatpinzette als guter Inhibitor. Um den genauen Hemmmechanismus zu bestimmen, wurde nach der Methode von *Putt* und *Hergenrother* die Kinetik von dem Komplex PARP-1:Phosphatpinzette untersucht.

Da PARP-1 zu dem Monoreaktanden-Modell zählt, konnten die Lineweaver-Burk Plots nur in Bezug auf das Substrat NAD^+ bestimmt werden. Es erfolgten Kinetikmessungen mit Variation der Substratkonzentrationen. Für die Phosphatpinzette wurde ein nichtkompetitiver Hemmmechanismus erhalten (Abbildung 1.2.2.4).

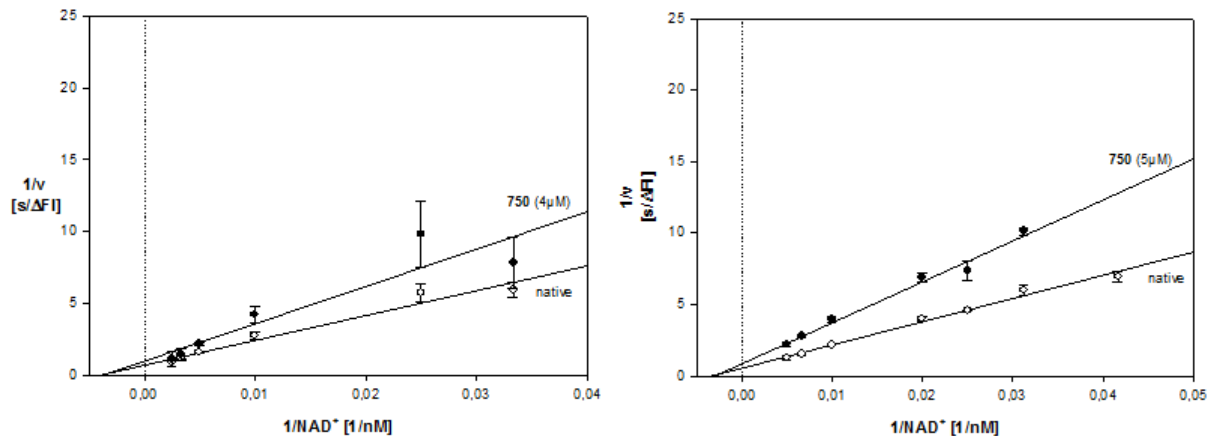


Abbildung 1.2.2.4: Lineweaver-Burk Plots der Phosphatpinzette.^[56]

Die Pinzette konkurriert somit nicht um die Substrat-Bindungsstelle, sondern inhibiert durch die Komplexierung kritischer basischer Aminosäuren auf der Proteinoberfläche. Dieser Hemmmechanismus konnte bereits bei der ADH eindeutig nachgewiesen werden.^[55] Da die beiden Zinkfinger motive FI und FII besonders Lysin- und Argininreich sind, gab es die Vermutung, dass die Pinzette dort angreift. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden Inhibitions- und Reaktivierungsexperimente durchgeführt. Die Reaktivierungsexperimente durch die Zugabe von Ac-Lys-OMe zeigten, dass ein großer Überschuss an Lysinderivat zugegeben werden muss, damit die PARP-1 Aktivität wieder um 80% steigt (~48 eq.). Die Bindung der Pinzette muss folglich wesentlich stärker an der Proteinoberfläche sein, als die bereits untersuchte Bindung der Pinzette an der ADH. Um die Vermutung der Komplexierung basischer Aminosäuren an den Zinkfinger motiven zu bestätigen, wurde ein Reaktivierungsexperiment durch die Zugabe von DNA durchgeführt. Da die Zinkfinger motive für die Bindung der DNA zuständig sind, müsste die Inhibierung der Pinzette an den Zinkfinger motiven durch einen Überschuss an DNA wieder rückgängig gemacht werden. Das Experiment zeigte, dass ein 10-facher Überschuss an DNA gegenüber der Assay-Konzentration 40% der PARP-1 Aktivität wiederherstellt und ein 100-facher Überschuss 50% wieder reaktiviert.

Als weitere Experimente zur Bestimmung des Angriffsortes der Pinzette wurden Fluoreszenztitrations- und ^1H -NMR Untersuchungen durchgeführt. Die fluorometrische Untersuchung der Bindung der DNA an der Phosphatpinzette zeigte eine geringe Bindungskonstante, die auf die π - π -Stapelwechselwirkungen zurückzuführen ist. Fluorometrische Untersuchungen von Übergangs-, Alkali- und Erdalkalimetallionen mit der Phosphatpinzette zeigten eine hohe Bindungsaffinität dieser an Zinkionen. Dies legt nahe, dass sich die Pinzette bevorzugt an den Zinkfingern bindet. Um eine Konkurrenz zwischen den Zinkionen und Lysin auszuschließen, wurden ^1H -NMR-spektroskopische Untersuchungen durchgeführt. Die Bindung von Lysinderivaten durch die Pinzette in An- und Abwesenheit von Zinkionen zeigte deutlich keine Veränderung der Komplexbildung mit Lysin. Es findet somit keine Konkurrenz zwischen diesen Bindungen statt. Zum Abschluss wurde noch mittels Molecular Modeling binäre Komplexe der Pinzette an den Zinkfingermodulen FI und FII simuliert. Die simulierten Strukturen blieben über 5 ns stabil und zeigen eine Bindung der Pinzette an jeweils zwei Lysinen nahe des Zinks mit zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen des Phosphats zu dem Zinkion.

1.3 Glucose-6-phosphat Dehydrogenase (G6PD)

1.3.1 G6PD

Die Glucose-6-phosphat Dehydrogenase (G6PD) ist eine Oxidoreduktase und katalysiert die Dehydrierung von Glucose-6-phosphat zu 6-Phosphoglucono- δ -lacton unter Reduktion von NADP^+ zu NADPH (Abbildung 1.3.1.1).^[78,79]

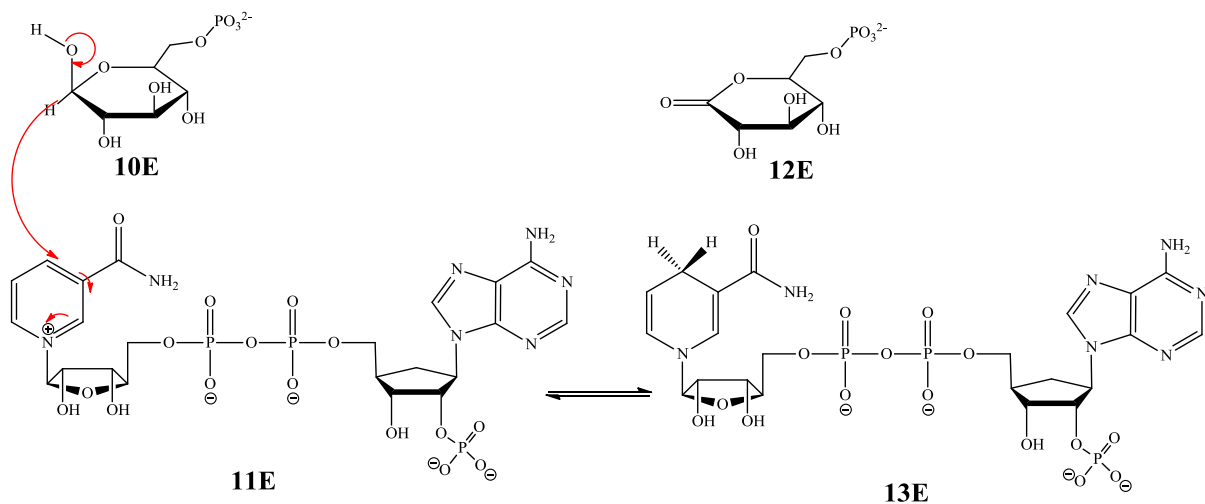


Abbildung 1.3.1.1: Oxidation von Glucose-6-phosphat (10E) zu 6-Phosphoglucono- δ -lacton (12E) mit Reduktion von NADP^+ (11E) zu NADPH (13E).

G6PD ist das Schlüsselenzym des Pentosephosphat-Zyklus und durch den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt das Schrittmacherenzym des Pentosephosphat-Weges. Der Pentosephosphatweg ist ein Sekundärweg der Glucoseoxidation (Glykolyse). Er erfüllt zwei wichtige Aufgaben: er liefert Ribose-5-phosphat, eine Pentose, die ein Grundbaustein aller Nukleotide ist. Zudem produziert er Reduktionsäquivalente in Form von NADPH/H^+ , die für die reduktive Biosynthese von Fettsäuren, Cholesterin und Steroiden, sowie zur Biotransformation in der Leber und zur Entgiftung von Peroxiden durch die Erythrozyten benötigt werden.^[80-83] Der Pentosephosphatweg läuft in jeder Zelle im Zytoplasma ab, um den Bedarf an NADPH/H^+ und Pentose in der Zelle zu decken. Er lässt sich in zwei Abschnitte einteilen, in den ersten irreversiblen oxidativen Teil, in dem NADPH/H^+ und Ribose-5-phosphat hergestellt werden, und in den zweiten reversiblen nicht-oxidativen Teil, der den Pentosephosphatweg und die Glykolyse vereinigt. Muskelzellen decken ihren Bedarf an Ribose, in dem sie den Pentosephosphatweg rückwärts zum Ribose-5-phosphat ablaufen lassen. Sie verhindern damit eine Herstellung von NADPH/H^+ , da sie dieses nicht verwerten

können. Erythrozyten nutzen die reduktive Wirkung von NADPH/H^+ zum Schutz vor Oxidation. Das durch den Pentosephosphatweg entstandene NADPH/H^+ wird von dem Enzym Gluthathionreduktase als Cofaktor genutzt, um das oxidierte atypische Tripeptid Glutathion-Disulfid (GSSG) in das reduzierte Glutathion (GSH) umzuwandeln. Das atypische Tripeptid Glutathion besteht aus drei Aminosäuren (Glutaminsäure, Cystein und Glycin), von denen die ersten beiden nicht in der normalen Art und Weise verknüpft sind. Das oxidierte Glutathion-Disulfid ist aus zwei Glutathion-Molekülen aufgebaut, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Das Glutathion (GSH) wird von den Zellen als Reduktionsmittel benötigt, da es durch Wasserstoffabgabe in der Lage ist, aggressive Oxidantien wie Sauerstoffradikale, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale in Wasser umzuwandeln. Durch die Regenerierung des Glutathion durch NADPH/H^+ bewahrt die G6PD dem Menschen den Schutz vor oxidativen Einflüssen.

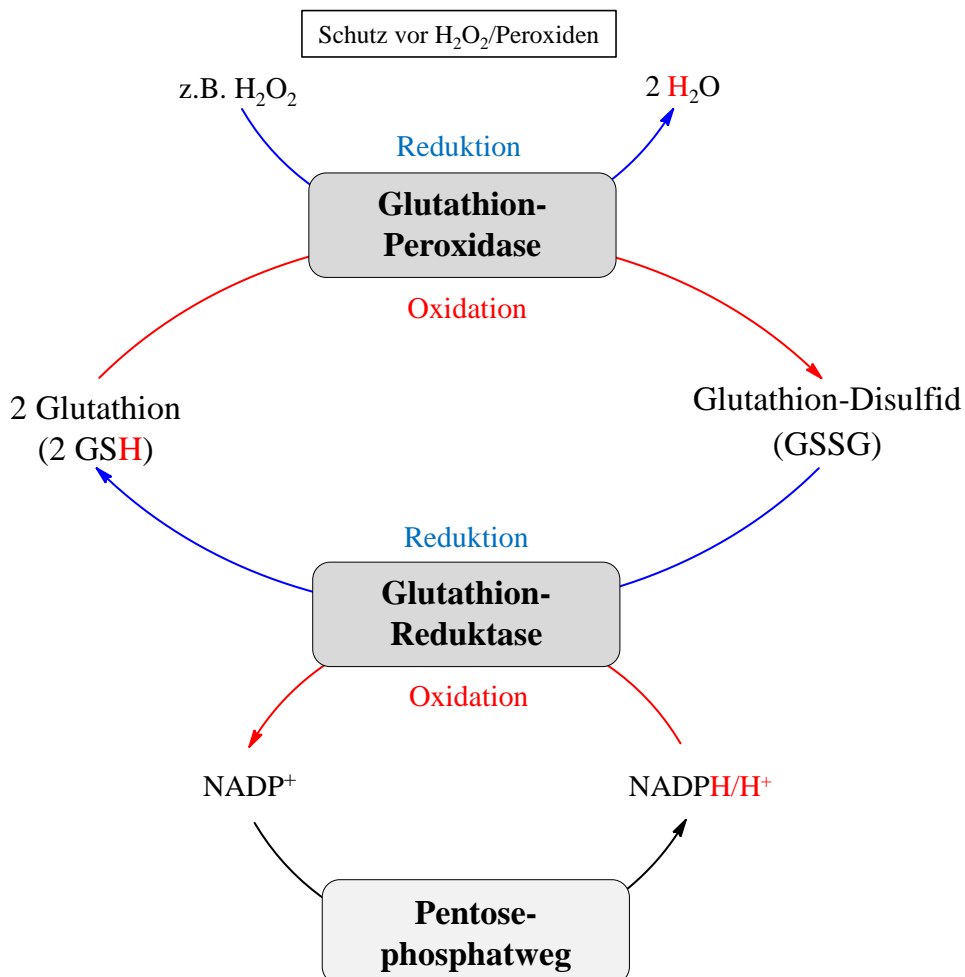


Abbildung 1.3.1.2: Oxidationsschutz durch NADPH/H^+ .

Eine der häufigsten Erbkrankheiten ist ein Defekt des Pentosephosphatweges.^[82,84] Dabei handelt es sich um einen Defekt des Schrittmacherenzym Glucose-6-phosphat Dehydrogenase, aufgrund eines Schadens am X-Chromosom. Durch die Unterversorgung der Erythrozyten mit NADPH/H^+ kann das Gluthation nicht regeneriert werden. So können Peroxide und schädliche Radikale nicht abgebaut werden, sondern schädigen die Zellmembran. Schließlich kommt es zur Auflösung der Erythrozytenmembran, die eine Zerstörung der roten Blutkörperchen zur Folge hat und zu einer schweren hämolytischen Anämie führen kann.^[85,86] Diese Erkrankung macht nur Probleme, wenn Patienten oxidativen Stress erleiden. Dieser wird durch Infektionen und Medikamente wie Aspirin oder Sulfonamid-Antibiotika, die die Schrittmacherreaktion des Pentosephosphatweges hemmen, ausgelöst. Als weiterer Auslöser dieser Krankheit ist der Genuss von dicken Bohnen (Fava-Bohne, Saubohne), die der Krankheit auch den Namen Favismus gab.

Die Glucose-6-phosphat Dehydrogenase kann eine monomere, eine dimere und eine tetramere Struktur aufweisen. Jedoch lediglich die dimere Form ist katalytisch aktiv. Die Dissoziation in die monomere Form hat eine Inaktivierung der enzymatischen Aktivität zur Folge. Die G6PD lässt sich in 59 kDa große Untereinheiten einteilen und kommt in zwei Isoformen vor. Die kurze Isoform mit 249 Aminosäuren ist in Erythrozyten und in der Leber vorhanden, die lange Isoform mit 515 Aminosäuren ist in Lymphoblasten, Granulozyten und Spermazellen vertreten. Bei der menschlichen G6PD sind Dimer und Tetramer durch ein schnelles Gleichgewicht miteinander verknüpft. Die Lage dieses Gleichgewichtes ist abhängig von dem pH -Wert und der Ionenstärke. Zudem begünstigt die Anwesenheit von NADP^+ und NADPH die Bildung des Tetramers.^[87]

Bei der Betrachtung der Röntgenstruktur der G6PD zeigt sich, dass sich in jeder Untereinheit ein NADP^+ Molekül befindet. Das katalytische NADP^+ besetzt als Cofaktor die Rossmann Spalte, während das strukturelle NADP^+ sich an der Dimeren-Schnittstelle und an dem C-Terminus befindet.^[80,82] Die Bindung dieses strukturellen NADP^+ ist mehr als 200mal stärker als die Bindung des Cofaktors. *Lam* und *Engel* haben bei Untersuchungen herausgefunden, dass wahrscheinlich das strukturelle NADP^+ zur Langzeitstabilität des Enzyms benötigt wird.^[82,88] Zudem wird vermutet, dass das strukturelle NADP^+ als möglicher Cofaktor-Speicher eingesetzt werden kann. Diese Vermutung basiert auf einer Annahme, dass sich die Konformation des Enzyms durch die Bindung des Substrat G6P am C-Terminus ändert und dadurch die Bindung zum strukturellen NADP^+ geschwächt wird. Ferner wird angenommen, dass viele Mutationen, die durch den Favismus hervorgerufen werden, die Stabilität des

Enzyms stören. Dieses strukturelle NADP^+ kommt jedoch nur in höheren Lebewesen vor. Bei den enzymkinetischen Messungen wurde aus diesem Grunde G6PD von *Saccharomyces cerevisiae* (G6PD der Bäckerhefe) verwendet, da sie eine hohe Übereinstimmung mit der menschlichen G6PD aufweist.^[89]

1.3.2 Bisherige Untersuchungen an der G6PD

Da die G6PD ein wichtiges Enzym des Stoffwechsels ist, kann eine effektive Hemmung durch potentielle Inhibitoren bei Krankheitsbildern wie z.B. Diabetes von großem Nutzen sein. Die meist eingesetzten Inhibitoren konkurrieren um die Substrat- oder Cofaktorbindungsstelle. Der bekannteste G6PD-Inhibitor ist das körpereigene Steroid Dehydroepiandrosteron (DHEA: Abbildung 1.3.2.1).^[90] Es ist ein Hormon der Nebennierenrinde und wird in die Sexualhormone Testosteron und Östrogen umgewandelt. Die Wirkung dieses Hormons liegt wahrscheinlich in der Bindung an den ternären Enzym-Cofaktor-Substrat-Komplex nach einem unkompetitiven Hemmmechanismus gegenüber Substrat und Cofaktor.^[91,92]

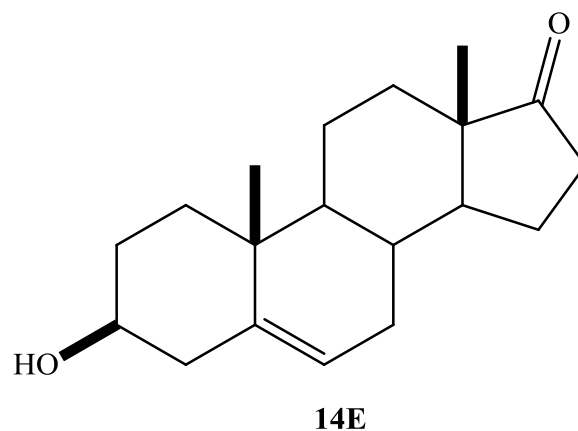


Abbildung 1.3.2.1: Strukturformel von DHEA (**14E**).

Da G6PD das Schrittmacherenzym des Pentosephosphatweges ist und somit die Zellen mit NADPH/H^+ und Ribosephosphaten beliefert, könnte eine Hemmung dieser die Proliferationsrate vieler Zelltypen verringern. Dies kann bei der Bekämpfung von Krebszellen von Vorteil sein.

Talbiersky untersuchte die inhibitorische Wirkung der Phosphatklammer in Bezug auf G6PD. Die Phosphatklammer wurde von *Klärner* entwickelt und von *Bastkowski* auf Komplexierung

untersucht. Sie ist in der Lage in ihrer Kavität NAD^+ mit einer Bindungskonstante von $K_d = 200 \mu\text{M}$ zu binden.

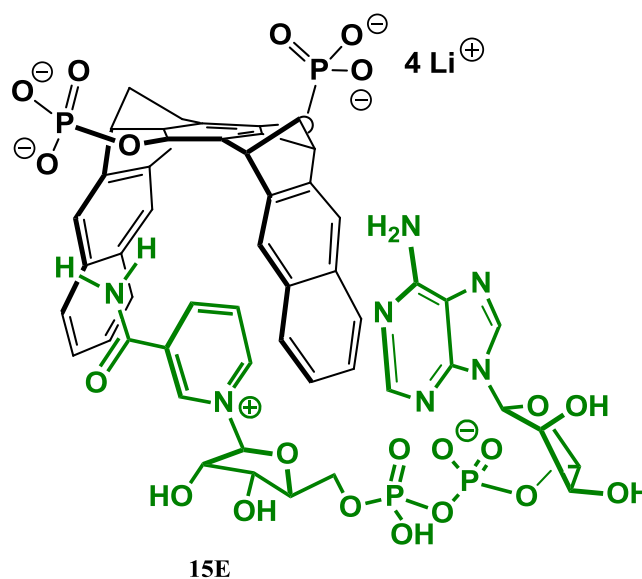


Abbildung 1.3.2.2: Komplexierung von NAD^+ durch die Phosphatklammer (**15E**).

Durch Fluoreszenztitration konnte offengelegt werden, dass der Cofaktor nur schwach in der Rossmann Spalte gebunden wird und somit eine Inhibierung durch die Klammer nicht unwahrscheinlich ist. So wurden zunächst die IC_{50} -Werte bestimmt, um zu gewährleisten, dass die Klammer ein potentieller Inhibitor ist. Es wurde ein IC_{50} -Wert erhalten, der mit $7 \mu\text{M}$ weit im substöchiometrischen Bereich liegt. Diese hohe Inhibitionsfähigkeit von der Phosphatklammer konnte nicht allein von der Komplexierung des Cofaktor herrühren. Durch Tests mit Modellverbindungen konnte der Phosphatgruppe eine zusätzliche Wechselwirkung zugeschrieben werden, welche wahrscheinlich mit der Proteinoberfläche agieren wird. Um den genauen Hemmmechanismus zu erhalten, wurden enzymkinetische Untersuchungen durchgeführt. Diese lieferten einen partiell unkompetitiven Hemmmechanismus.

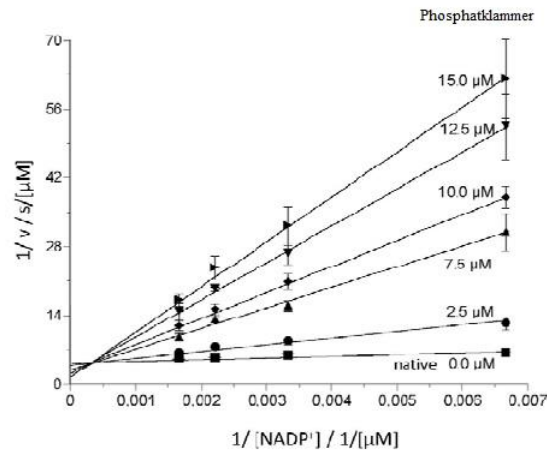


Abbildung 1.3.2.3: Lineweaver-Burk Plot der Phosphatklammer mit variabler Cofaktorkonzentration.^[56]

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein ternärer Komplex der Klammer postuliert, in dem diese an dem Enzym-Cofaktor-Komplex bindet und gleichzeitig in seiner Kavität NADP^+ komplexiert. Die Klammer ist somit Gast gegenüber dem Enzym und Wirt gegenüber dem Cofaktor. Durch Inhibitions- und Reaktivierungsexperimente ließ sich zeigen, dass durch die Zugabe von fünf Äquivalenten an NADP^+ das Enzym wieder 100% Aktivität erhält. Die vollständige Enzyminhibition durch die Klammer lässt sich nicht mit dem zuvor ermittelten partiell unkompetitiven Hemmmechanismus erklären. Es wurde daraufhin die Kinetikmessung mit variabler Substratkonzentration wiederholt. Nach diesem liegt ein gemischter Substrat-Hemmmechanismus vor.

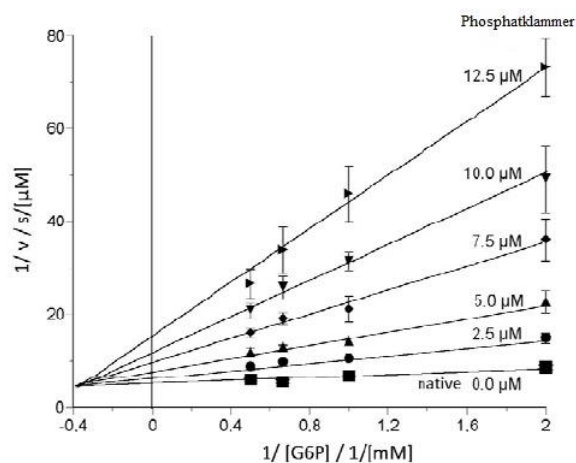


Abbildung 1.3.2.4: Lineweaver-Burk Plot mit variabler Substratkonzentration.^[56]

Es scheint somit, dass die Klammer nicht nur einen ternären Komplex mit dem Cofaktor in der Rossmann Spalte ausbildet, sondern auch in der Substratbindungstasche bindet. Die

Inhibition durch die Klammer erfolgt somit auf zwei Wegen. Eine Bindung des Substrats in der Kavität der Klammer konnte mittels ^1H -NMR-Spektroskopie ausgeschlossen werden. Ferner konnten durch ITC-Messungen die Bindungen der Klammer an der Substrat- und an der Cofaktorbindungsstelle bestätigt werden.^[93]

Durch Molecular Modeling mit Hilfe von Kristallstrukturen der G6PD aus der Proteindatenbank (PDB) konnten äußerst stabile Komplexstrukturen ermittelt werden, in denen einerseits der ternäre Komplex der Klammer in der Rossmann Spalte mit dem Cofaktor gebildet wird und andererseits die Klammer anstelle des Substrates in der Substratbindungstasche sitzt und mit den Phosphationen Wechselwirkungen mit den basischen Aminosäuren in der näheren Umgebung ausübt. Ferner zeigte sich in der Substratbindungstasche, dass die beiden Naphthalinseitenwände der Klammer π - π -Stapelwechselwirkungen mit Histidin ausübten.

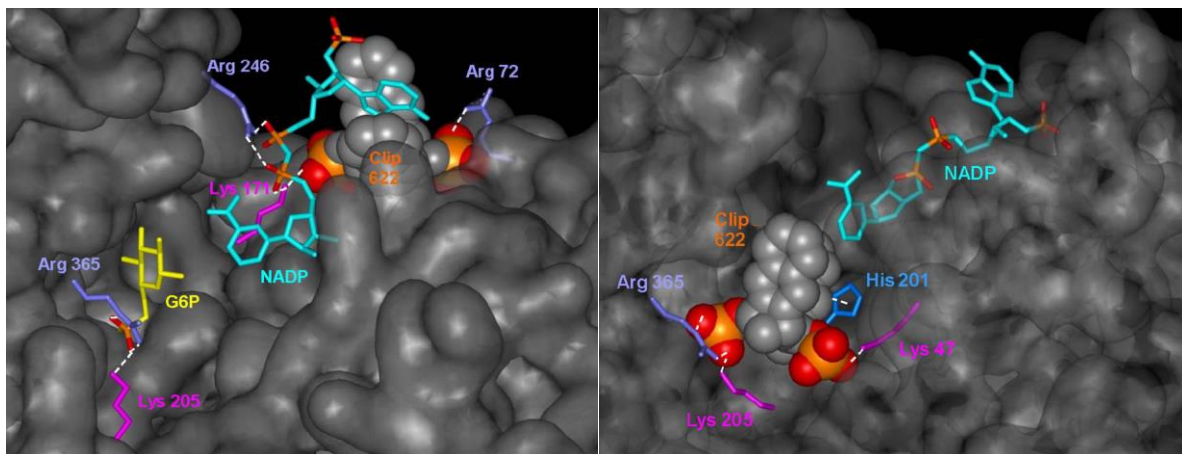


Abbildung 1.3.2.5: MD-Simulation der Hemmung von G6PD durch die Phosphatklammer. Links: Ausbildung des ternären Komplexes, rechts: Ausbildung des binären Komplexes (MacroModal 9.0, Wasser, OPLS-A, 300 K, 0.6 ns).^[56]

2. Aufgabenstellung

Wie bereits schon in der Einleitung erwähnt, sind die wasserlöslichen Phosphatpinzetten in der Lage Lysine und Arginine stark zu binden.^[50]

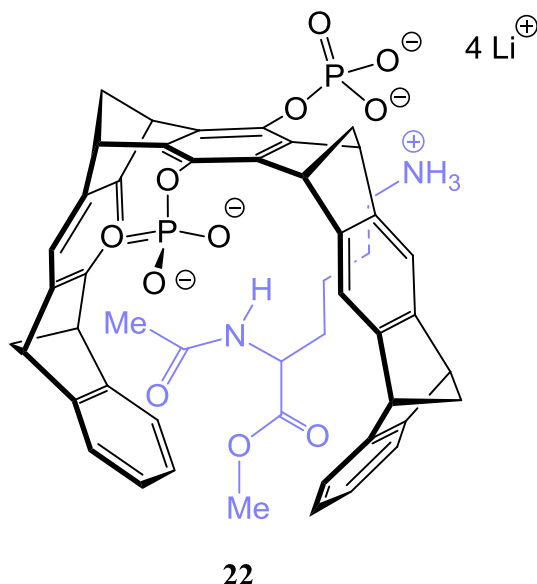


Abbildung 2.1: Bindung von Ac-Lys-OMe in der Kavität der Phosphatpinzette 22.

Durch diese Bindungsaffinität ist es möglich, Enzyme in ihrer Aktivität einzuschränken, bzw. zu inhibieren. Es wurden bereits Untersuchungen über die Inhibierung der Alkohol-Dehydrogenase (ADH) durch die Phosphatpinzette veröffentlicht.^[54,56] Als weitere Dehydrogenase wurde die Glucose-6-phosphat Dehydrogenase (G6PD), das Schrittmacherenzym des Pentosephosphatweges, erfolgreich durch die Phosphatklammer inhibiert. Da vergleichsweise die Inhibierung durch die Phosphatpinzette höher, bzw. im niedrigeren IC₅₀-Wert liegt, bestand eine Hauptaufgabe in dieser Doktorarbeit darin, die Inhibierung der G6PD durch die Phosphatpinzette zu untersuchen und den genauen Bindungsmechanismus zu erläutern. Die enzymkinetischen Untersuchungen wurden mit Hilfe des Universitätsklinikums Essen in einer Kooperation mit *Michael Kirsch* durchgeführt. Ferner sollten Untersuchungen zu der Bindungsart und der daraus resultierenden Enzymveränderung mittels CD-Spektroskopie und Mikrokalorimetrie untersucht werden.

Ein weiteres Themengebiet dieser Arbeit befasste sich mit dem Enzym Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP-1). Dieses Enzym wurde bereits mittels enzymkinetischer Versuche auf die Inhibierung der Phosphatpinzette untersucht. Es wurde eine Bindungsaffinität von einem

IC_{50} -Wert = $3.8 \mu M$ ermittelt und eine Kinetik eines nichtkompetitiven Hemmmechanismus erhalten. Die Phosphatpinzette greift somit sowohl am Enzym, als auch am Enzym-Substrat-Komplex an. Es wurde ein Mechanismus postuliert, in dem die Phosphatpinzette basische Aminosäuren an den Zinkfingern bevorzugt komplexiert, da sie auch eine hohe Bindungsaffinität zu Zinkionen aufweist.^[56] Dies konnte jedoch nicht eindeutig bewiesen werden. Teil dieser Arbeit war somit, den genauen Bindungsort der Pinzette zu lokalisieren. Es stellte sich die Frage, ob die Pinzette direkt am Zinkfinger bindet und somit die DNA von diesem verdrängt. Diese Frage sollte mit einer molekularbiologischen Untersuchung geklärt werden. Die Untersuchung fanden am Uniklinikum Essen im Arbeitskreis von *Prof. Fandray* in Rücksprache mit *Dr. Uta Berchner-Pfannschmidt* statt, da dort die geeigneten Laborausrüstungen vorlagen. Des Weiteren wurden bei diesen Untersuchungen die Kinetikmessungen mit verschiedenen Pinzettenkonzentrationen durchgeführt, um den Bindungsmechanismus einer nichtkompetitiven Hemmung auch für geringere und höhere Konzentrationen zu bestätigen.

Ferner war ein Bestandteil dieser Arbeit, neue molekulare Pinzetten zu entwickeln und zu untersuchen. Grundlegend war dabei der Vergleich von der bereits bekannten Phosphatpinzette mit Pinzetten, die andere Anionen tragen. Diese verschiedenen Anionen sollten Aufschluss darüber geben, inwieweit sie die Bindungsaffinität der Pinzette beeinflussen. Bereits vor einigen Jahren wurden Klammern mit verschiedenen Anionen untersucht.

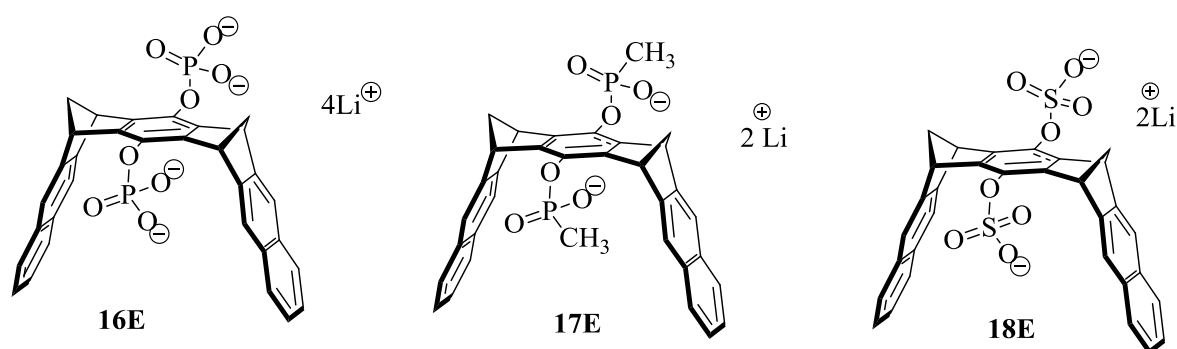


Abbildung 2.2: Von *Klärner et al.* hergestellten Klammern mit unterschiedlichen Anionen. **16E:** Phosphatklammer, **17E:** Phosphonatklammer, **18E:** Sulfatklammer.

Diese Klammern wurden auch im Bereich der unterschiedlichen Bindungsaffinität untersucht. Es wurde von *Klärner et al.* herausgefunden, dass die Phosphatklammer wesentlich stärker als

die Phosphonatklammer bindet. Dies kann auf die Säurestärke des Phosphations zurückgeführt werden. Außerdem wurde herausgefunden, dass die Sulfatklammer eine höhere Bindungsaffinität zum Kosower Salz und zu NMNA aufweist.^[94]

Da bereits die Phosphat-, sowie Phosphonatpinzette ausgiebig von *Bastkowski* und *Talbiersky* auf die Bindungsaffinität von unterschiedlichen Aminosäurederivaten und Peptide untersucht wurde, sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Pinzette mit einem Carboxylat als Anionenpaar (**24**) entwickelt und mit den bereits untersuchten Pinzetten verglichen werden. So wurde von *Dutt* die Sulfatpinzette entwickelt (**20E**), untersucht und im Rahmen seiner Doktorarbeit mit der Phosphat-, Phosphonat- und der Carboxymethylpinzette verglichen.^[95]

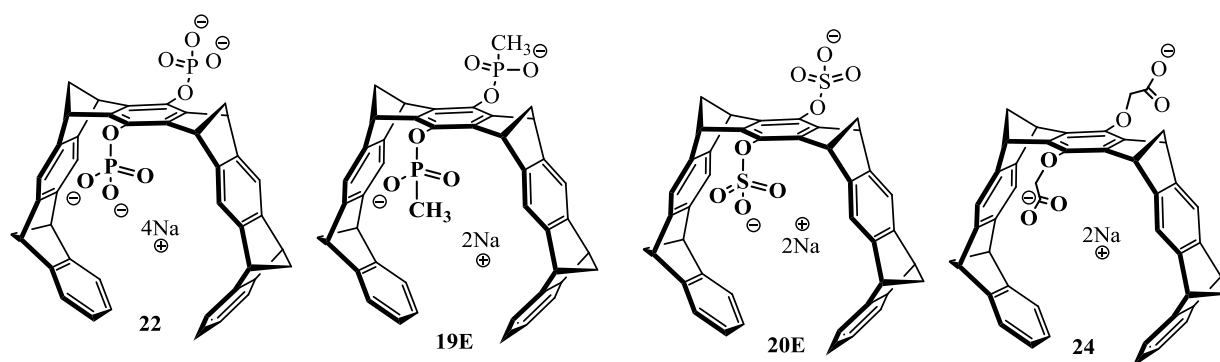


Abbildung 2.3: Pinzetten mit unterschiedlichen Anionen. **22:** Phosphatpinzette, **19E:** Phosphonatpinzette, **20E:** Sulfatpinzette, **24:** Carboxymethylpinzette.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Carboxymethylpinzette (**24**) entwickelt und die Bindungsaffinität mittels ¹H-NMR-Spektroskopie, Fluoreszenzspektroskopie und Mikrokalorimetrie untersucht werden. Moleküldynamische Simulationen sollten Aufschluss über den Bindungsmechanismus geben und die Bindungsaffinität dieser Pinzette erklären.

Um einen noch besseren Überblick über die verschiedenen Bindungsaffinitäten der Anionenpinzetten zu erhalten, sollte in dieser Doktorarbeit des Weiteren eine Pinzette mit zwei verschiedenen Anionen synthetisiert werden.

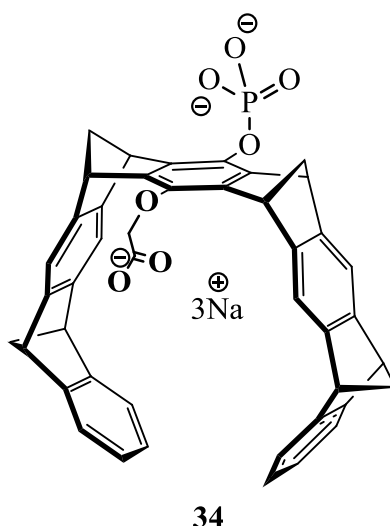


Abbildung 2.4: Neue molekulare Pinzette, die zwei verschiedene Anionen trägt.

Diese Pinzette soll Aufschluss darüber geben, ob eine Affinität der Gäste vorliegt und in welcher Weise sie in der Kavität der Pinzette gebunden werden. Diese Pinzette sollte mittels ^1H -NMR Spektroskopie, Fluoreszenz und Mikrokalorimetrie untersucht und die Bindung durch Molecular Modeling simuliert werden.

Um die molekularen Pinzetten für spezifische Lysine zu gestalten, wurden bereits unsymmetrische Pinzetten im Arbeitskreis *Schrader* entwickelt. Die von *Gersthagen* entwickelte und untersuchte Monophosphatpinzette zeigte eine hohe Bindungsaffinität für die C-terminus geschützten Lysin- und Argininderivate. Nun sollte untersucht werden inwieweit eine strukturelle Veränderung der unsymmetrischen Pinzette für Auswirkungen auf die Bindungsaffinität hat. Untersucht werden sollte dazu die der Monophosphatpinzette im Aufbau ähnliche Methoxyphosphatpinzette.

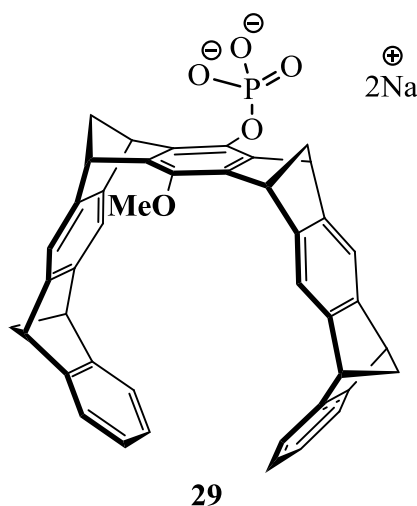


Abbildung 2.5: Methoxyphosphatpinzette 29.

Untersuchungen mittels ^1H -NMR Spektroskopie und Fluoreszenz sollten Aufschluss über die Bindungsaffinität geben. Moleküldynamische Simulationen sollten die Bindungsaffinität deutlich machen.

Die Untersuchung dieser einfachen unsymmetrischen Pinzette sollte einen Überblick darüber geben, inwieweit die Linker einen Einfluss auf die Kavität, bzw. die Bindungsaffinität haben. Ferner sollten diese Untersuchungen für die weitere Linkerentwicklung von Vorteil sein. So weiß man bereits, dass eine Etherverknüpfung des Linkers Hydrolyse unempfindlicher ist als eine Esterverbindung.

3. Durchführung und Ergebnisse

3.1 Methoden

3.1.1 Fluoreszenztitrationen

Bei Fluoreszenztitrationen handelt es sich um eine empfindliche Methode zur Bestimmung von Assoziationskonstanten (K_a) in einer Größenordnung von $\leq 10^8 \text{ M}^{-1}$. Bei der Titration wird die Fluoreszenzintensität eines Rezeptors, dessen Konzentration während der gesamten Titration über konstant gehalten wird, in Abhängigkeit von der Konzentrationserhöhung des Substrats beobachtet.^[96] Die Intensitätsänderung (ΔI_{obs}) wird hervorgerufen durch eine Rezeptor-Substrat-Komplexbildung und steht mit der Assoziationskonstanten (K_a) im folgenden Zusammenhang:

$$\Delta I_{\text{obs}} = \frac{\Delta I_{\text{max}}}{[S]_0} \cdot \left(\frac{1}{2} \cdot \left([R]_0 + [S]_0 + \frac{1}{K_a} \right) - \sqrt{\frac{1}{4} \cdot \left([R]_0 + [S]_0 + \frac{1}{K_a} \right)^2 - [R]_0 \cdot [S]_0} \right) \quad (1)$$

3.1.2 Bindungsexperimente mittels ^1H -NMR-Titrationen

Die Pinzettenmoleküle haben durch die magnetische Anisotropie der Areneinheiten einen großen Einfluss auf die magnetische Umgebung, welches sich in der chemischen Verschiebung der Protonen widerspiegelt.^[97] So beeinflussen die Protonen des Substratmoleküls die chemische Verschiebung der Protonen des Rezeptormoleküls und umgekehrt haben die Protonen des Rezeptors Einfluss auf die chemische Verschiebung der Protonen des Substrats. Durch diesen Effekt lässt sich die Komplexierungseigenschaft von Rezeptoren mittels ^1H -NMR-Spektroskopie ermitteln. Die chemische Verschiebung der Substratprotonen ist im Komplex einerseits abhängig von der intramolekularen Position des Protons im Substrat selber, sowie andererseits von der Position des Protons relativ zur Rezeptorkavität. Liegen Protonen im Anisotropiekegel der Areneinheiten, werden sie abgeschirmt und hochfeldverschoben. Liegen die Protonen hingegen in einer Ebene mit dem Arensystem, werden sie entschirmt und tieffeldverschoben. Diese Effekte begründen sich auf den diamagnetischen Ringstromeffekt. Da nach der Erfahrung die chemische Verschiebung

der Substratprotonen sich bei einer Komplexbildung stärker ändern als die chemische Verschiebung der Rezeptorprotonen, werden zur Auswertung die chemischen Verschiebungen der Substratprotonen zur Auswertung der ^1H -NMR-Titration verwendet. Betrachtet man die maximale komplexinduzierte Verschiebung ($\Delta\delta_{\text{max}}$), die durch die ^1H -NMR-Titration für verschiedene Protonen bestimmt werden kann, kann man sogar einen qualitativen Einblick in die Komplexgeometrie erlangen. Die Assoziationskonstante (K_a) lässt sich aus der Abhängigkeit der chemischen Verschiebung vom Verhältnis Rezeptor zum Substrat bestimmen, aus der dann auch die freie Bindungsenthalpie (ΔG) berechnet werden kann. Da in der Regel die Komplexbildung und Komplexdissoziation gegenüber der NMR-Zeitskala schnell erfolgen, können nur die gemittelten Signale von freiem und komplexiertem Substrat beobachtet werden. Die Abhängigkeit der komplexinduzierten Hochfeldverschiebung ($\Delta\delta_{\text{obs}}$) zur Assoziationskonstanten (K_a) wird durch folgende Gleichung beschrieben.^[98,99]

$$\Delta\delta_{\text{obs}} = \frac{\Delta\delta_{\text{max}}}{[\text{S}]_0} \cdot \left(\frac{1}{2} \cdot ([\text{R}]_0 + [\text{S}]_0 + \frac{1}{K_a}) - \sqrt{\frac{1}{4} \cdot ([\text{R}]_0 + [\text{S}]_0 + \frac{1}{K_a})^2 - [\text{R}]_0 \cdot [\text{S}]_0} \right) \quad (2)$$

Analog dazu kann auch die Dimerisierung (K_{dim}) eines Rezeptors, bzw. die Selbstassoziation eines Rezeptors durch eine ^1H -NMR-Titration bestimmt werden. Da die Assoziation und Dissoziation ebenfalls schnell gegenüber der NMR-Zeitskala erfolgen, werden wieder nur gemittelte Signale des freien und assoziierten Rezeptors beobachtet. Die Abhängigkeit der komplexinduzierten Hochfeldverschiebung ($\Delta\delta_{\text{obs}}$) von der Rezeptorgesamtkonzentration ($[\text{R}]_0$) wird durch folgende Gleichung beschrieben.

$$\Delta\delta_{\text{obs}} = \frac{\Delta\delta_{\text{max}}}{[\text{R}]_0} \cdot \left([\text{R}]_0 + \frac{1}{4 \cdot K_{\text{dim}}} - \sqrt{\frac{[\text{R}]_0}{2 \cdot K_{\text{dim}}} + \frac{1}{16 \cdot K_{\text{dim}}^2}} \right) \quad (3)$$

3.1.3 UV/Vis-Schmelzkurven

Bei der Generierung komplementärer DNA-Einzelstränge zu einem DNA-Doppelstrang werden Wasserstoffbrückenbindungen und π - π -Stapelwechselwirkungen zwischen den Basenpaaren ausgebildet. Bei Temperaturerhöhung dissoziiert der DNA-Doppelstrang wieder in die Einzelstränge, da die Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen und die π - π -Stapelwechselwirkungen der Basenpaare aufgehoben werden. Diesen Vorgang bezeichnet man als DNA-Schmelzen. Die Schmelztemperatur T_m (melting temperature) ist die Temperatur bei der 50% des Doppelstranges dissoziiert vorliegt und gibt die thermische Stabilität des Doppelstranges wieder. Diese Stabilität ist abhängig von der jeweiligen Basenzusammensetzung, von der Oligomerlänge und der Salzkonzentration. Die Schmelztemperatur erhöht sich mit steigendem GC-Gehalt, da die Basen Guanin (G) und Cystein (C) drei Wasserstoffbrückenbindungen eingehen können und die Basen Adenin (A) und Thymin (T) nur zwei Bindungen bilden. Nukleinbasen absorbieren UV-Licht bei einem charakteristischen Absorptionsmaximum von 260 nm. So kann die DNA-Schmelzkurve durch die Messung der UV-Absorption der DNA in Abhängigkeit von der Temperatur aufgenommen werden. Bei dem Schmelzprozess wird die UV-Absorption durch die Auflösung der Basenstapelung und der daraus resultierenden Denaturierung erhöht. Der DNA-Doppelstrang besitzt einen geringeren molaren Absorptionskoeffizienten als die Summe der molaren Absorptionskoeffizienten der einzelnen Basen. Die erhaltene Schmelzkurve zeigt einen sigmoidalen Verlauf, der auf einen kooperativen Schmelzvorgang hinweist. Das Aufbrechen benachbarter Basenpaare wird durch das Schmelzen einzelner Basenpaare begünstigt. Der Schmelzpunkt eines DNA-Doppelstranges entspricht dem Wendepunkt der Schmelzkurve und kann mit der 1. Ableitung bestimmt werden.

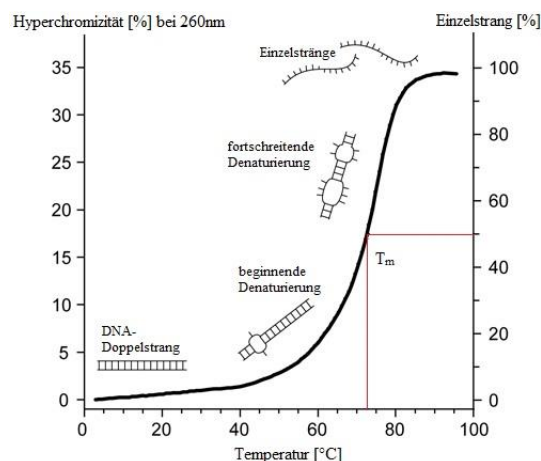


Abbildung 3.1.3.1: DNA-Schmelzkurve.

3.1.4 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Durch die Wechselwirkung von Proteinen mit DNA werden viele Zellprozesse, wie z.B. DNA Replikation, Rekombination und Reparatur, Transkription und auch die Virusreifung zentral gesteuert. Eine Technik zur zentralen Untersuchung von Genregulationen und Bestimmung von Protein:DNA Wechselwirkungen ist der Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA). Der EMSA ist eine schnelle und sensitive Methode, um Protein-Nukleinsäuren-Wechselwirkungen zu detektieren. Die Methode beruht darauf, dass die Wanderungsgeschwindigkeit eines Nukleinsäure-Komplex in einem nicht denaturierenden Polyacrylamid- oder Agarosegel wesentlich geringer ist als von der freien Nukleinsäure, wenn ein elektrisches Feld angelegt wird.^[100,101] Da die auftretende DNA-Bande durch die Proteinbindung im Vergleich zu der freien DNA im Gel weiter fortbewegt (shift) wird oder zurückbleibt (retarded), wird der Assay auch als Gel-Shift oder Gel-Retarded Assay bezeichnet. Seit der Entwicklung des EMSAs durch *Fried* und *Crother*^[102], sowie *Garner* und *Revzin*^[103], werden Protein:DNA-Wechselwirkungen vorzugsweise mit Nitrocellulose Filter-Binding Assays untersucht.^[104] Der Vorteil der Untersuchung von DNA:Protein-Wechselwirkungen mit einem EMSA besteht in der Möglichkeit, Komplexe verschiedener Stöchiometrie oder Konformation zu lösen, bzw. zu detektieren. Ein anderer großer Vorteil für die häufigen Anwendungen ist der, dass das DNA-bindende Protein nicht vollständig gereinigt sein muss oder aber ein aus Zellextrakt gewonnenes Produkt sein kann. Gel-Shift Assays können qualitativ genutzt werden, um sequenz-spezifische DNA-bindende Proteine zu identifizieren (wie Transkriptionsfaktoren), oder um wichtige Sequenzbindungen zu untersuchen, die aus Genen mit steigender Regulationsregion gewonnen werden. EMSAs können zudem auch zur quantitativen Messung von thermodynamischen und kinetischen Parameter genutzt werden.^[102-106] Die Fähigkeit die Protein:DNA Komplexe in kürzester Zeit zu detektieren, beruht auf der großen Stabilität der Komplexe (annähernd eine Minute), wenn sie in das Gel wandern. Die sequenz-spezifischen Wechselwirkungen sind kurzlebig und werden durch die relativ geringen ionischen Kräfte des Elektrophorese-Puffers stabilisiert. Nach Eintritt ins Gel wird das Gleichgewicht von freier und gebundener DNA eingestellt, da sich die Protein-Komplexe schnell von der freien DNA lösen. Durch die „Käfig“-Effekte der Gelmatrix wird der Komplex jedoch gut stabilisiert. Die verbleibende Komplexkonzentration wird im Gel hoch lokalisiert und so entsteht eine schnelle Förderung der Reassoziaton, auch wenn der Komplex dissoziiert.^[102,105] So können auch labile Komplexe durch diese Methode dargestellt werden.^[107-109]

3.1.5 Circular-Dichroismus-Spektroskopie

Die Circular-Dichroismus(CD)-Spektroskopie ist eine sehr sensible chiroptische Methode zur Detektion der absoluten Konfiguration und Konformation von Molekülen. Zudem können mit Hilfe der CD-Spektroskopie Sekundärstrukturen von Biomolekülen, wie z.B. Proteinen und Polynukleotiden charakterisiert werden. Die Grundlage des Verfahrens beruht auf der unterschiedlichen Absorption von links und rechts circularpolarisiertem Licht in einer optisch aktiven Substanz. Es gilt $\varepsilon_L \neq \varepsilon_R$. Die Differenz $\Delta\varepsilon$ wird als Circular dichroismus bezeichnet.

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R \neq 0 \quad (4)$$

Durch den Circular dichroismus wird ein Effekt verursacht, der als Elliptizität beschrieben wird. Der circularpolarisierte Lichtstrahl ist so definiert, dass die Spitze des elektrischen Vektors eine Schraubenlinie beschreibt. Durch die unterschiedliche Absorption bewegen sich die rechts und links circularpolarisierten Lichtstrahlen mit verschiedenen Geschwindigkeiten und verschiedenen Wellenlängen ($\lambda_L \neq \lambda_R$) durch die untersuchte Substanz fort. Der Summenvektor hält dabei nicht seine Richtung bei, sondern wird um einen Winkel α gedreht und beschreibt eine Ellipse. Dieser Winkel wird mathematisch durch den Winkel θ , der sogenannten Elliptizität bestimmt.

$$\theta = \arctan \frac{b}{a} \quad (5)$$

(mit a = Hauptachse, b = Nebenachse der Ellipse).

Mit Hilfe der spezifischen Elliptizität $[\theta]$, lässt sich die molare Elliptizität berechnen, die häufig in CD-Spektren angegeben wird.

$$[\theta] = \frac{100 \cdot \theta}{c \cdot d} \quad (6)$$

(mit c = Konzentration, d = Schichtdicke)

$$[\theta]_M = \frac{[\theta] \cdot M}{100} \quad (7)$$

Nach den üblichen Messbedingungen ist die molare Elliptizität mit der Differenz $\Delta\varepsilon$ wie folgt verknüpft.

$$[\theta]_M \approx 3300 \cdot \Delta\varepsilon \quad (8)$$

In einem CD-Spektrum ist $\Delta\varepsilon$ oder die Elliptizität θ als Funktion der Wellenlänge aufgetragen.

Circular Dichroismus wird nur detektiert, wenn die Elektronenanregung durch das Licht mit einer Ladungstranslation (elektrisches Dipolmoment) und mit einer Ladungsrotation (magnetisches Dipolmoment) einhergeht. Nur chirale oder achirale Chromophore, bei denen das System in chiraler Weise gestört wird, können detektiert werden.^[115-117]

Der Circular Dichroismus von Proteinen beruht auf den asymmetrischen Elementen des Peptidrückrates, sowie auf den chiralen Aminosäuren. Mit Ausnahme der einfachen Aminosäure Glycin besitzen alle Aminosäuren ein asymmetrisches C_α -Atom in Nachbarschaft der Peptidbindung, das eine Asymmetrie in der Elektronenkonfiguration der Peptidbindung hervorruft. Dadurch erfolgt eine unterschiedliche Absorption von links und rechts circular polarisiertem Licht, das Proteine intrinsisch optisch aktiv macht.

In einem CD-Spektrum von Proteinen erhält man zwei charakteristische Spektralbereiche. In dem Wellenlängenbereich von 160 nm bis 230 nm erhält man den ersten Spektralbereich, der auch als Peptidbereich bezeichnet wird. Der zweite Spektralbereich wird in dem Wellenlängenbereich von 240 nm bis 300 nm detektiert, der auf den CD-Effekten aromatischer Aminosäuren beruht. α -Helices, β -Faltblattstrukturen und zufällig verknäulte Proteine (random coils) besitzen alle ein charakteristisches CD-Spektrum. So zeigt die α -Helix zwei charakteristische Banden im negativen Bereich bei 206 nm ($n \rightarrow \pi^*$) und 222 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$), sowie eine charakteristische Bande im positiven Bereich bei einer Wellenlänge von 196 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$). Das zufällig verknäulte Protein zeigt lediglich eine Bande im negativen Bereich bei einer Wellenlänge von 190 nm.^[110-114]

3.1.6 Isotherme Mikrokalorimetrie (ITC)

Bei der isothermen Mikrokalorimetrie handelt es sich um eine effektive Methode, thermodynamische Daten von Wirt-Gast-Komplexen zu erhalten.^[118-120] Durch die Titrationskurve lässt sich neben der Assoziationskonstanten K_a auch die Bindungsenthalpie ΔH , die Gibbs-Energie ΔG , sowie auch die Entropie ΔS erhalten. Dies stellt einen großen Vorteil für Komplexstudien supramolekularer Systeme dar.^[121-123] Finden die Messungen unter isothermen Bedingungen statt, lassen sich direkt die Bindungswärme Q und die Bindungsenthalpie ΔH bestimmen. Durch die Messung der Bindungswärme in Abhängigkeit der Wirt-Gast-Konzentrationen lässt sich durch nicht lineare Regression die Bindungskonstante K_a für eine gegebene Stöchiometrie bestimmen. Die Enthalpie ΔH , Gibbs-Energie ΔG und die Entropie ΔS lassen sich durch folgende Formeln bestimmen:

$$\Delta G = -RT \ln K_a \quad (9)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (10)$$

(R: universelle, allgemeine Gaskonstante, T: Temperatur in Kelvin, K_a : Assoziationskonstante, ΔG : Gibbs-Energie des Komplexes, ΔH : Freie Enthalpie des Komplexes, ΔS : Entropie des Komplexes)

Zusammengefügt ergibt sich:

$$-RT \ln K_a = \Delta H - T\Delta S \quad (11)$$

3.2 Synthese der Pinzetten

3.2.1 Synthese des Grundgerüsts molekularer Pinzetten

Zu Beginn der Doktorarbeit musste zunächst die molekulare Pinzette synthetisiert werden. Zur Darstellung wurde die von *Klärner et. al.* etablierte Syntheseroute genutzt. Die Synthese setzt sich zusammen aus der zentralen Benzospacer-Einheit, dem Dien-Seitenarm, sowie der Verknüpfung beider Elemente zum Pinzettengrundgerüst. Dieses Pinzettengrundgerüst diente als Ausgangsverbindung für die darauffolgenden Synthesen.

3.2.1.1 Synthese der zentralen Benzospacer-Einheit

Die Synthese des Diacetoxy-Benzospacers setzt sich aus vier Reaktionsschritten zusammen. Der erste Schritt beinhaltete eine Diels-Alder-Reaktion von frisch destilliertem Cyclopentadien (**1**) mit *p*-Benzochinon (**2**). Das 1:1 Addukt (**3**) wurde basenkatalytisch mit Triethylamin zum Hydrochinon **4** enolisiert und im Anschluss mit *p*-Benzochinon (**2**) zum Chinon **5** oxidiert. Dann erfolgte eine weitere Diels-Alder-Reaktion mit frisch destilliertem Cyclopentadien (**1**), bei der ein *syn/anti*-Isomerengemisch entstand. Durch fraktionierende Kristallisation ließ sich ein 95 %ig reines *syn*-Addukt **6a** gewinnen. Das *syn*-Addukt **6a** wurde mit dem Acylierungsreagenz Essigsäureanhydrid zweifach basenkatalytisch zum Bisdienophil **7** enolisiert. Der komplette Syntheseweg des Diacetoxy-Benzospacers ist im Folgenden dargestellt.^[124,125]

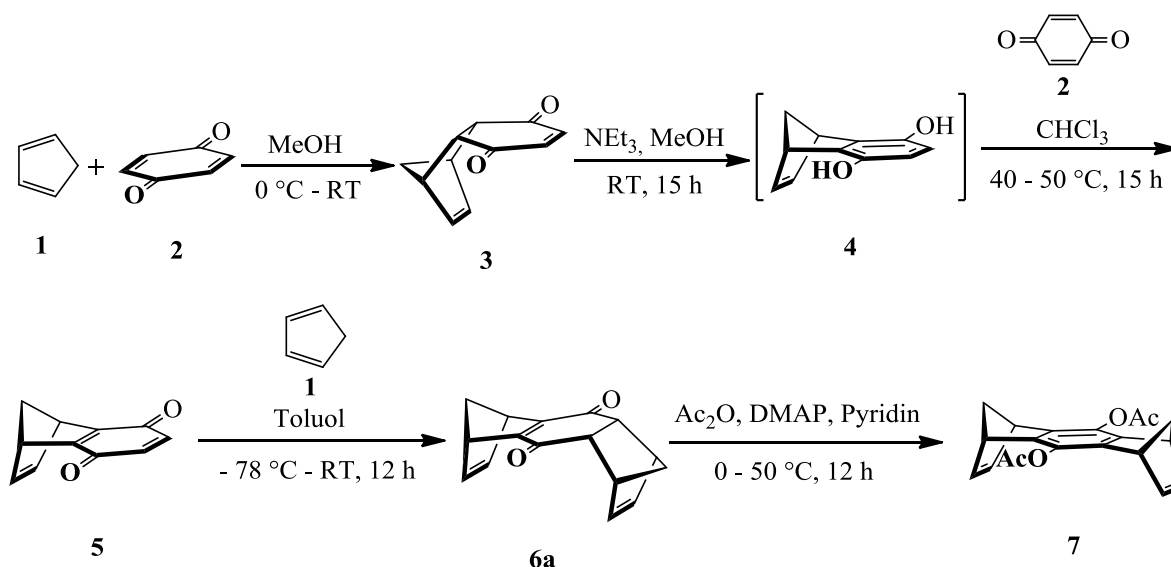


Abbildung 3.2.1.1: Syntheschema der zentralen Benzospacer-Einheit **7**.

3.2.1.2 Synthese der Dien-Seitenwand

Die Synthese der Dien-Seitenwand setzt sich aus sechs Syntheseschritten zusammen, die mit einer Diels-Alder-Reaktion von Inden (**8a**) mit Maleinsäureanhydrid (**9**) begann. Die Synthese fand bei Temperaturen oberhalb von 180 °C statt, bei der eine 1,5-*H*-sigmatrope Umlagerung des Indens (**8a**) zum instabileren 2*H*-Inden (**8b**) erfolgte. Das gebildete Isoinden (**8b**) reagierte als *o*-chinoides System mit Maleinsäureanhydrid (**9**) als Dienophil in einer Diels-Alder-Reaktion zum 1:1 Endo-Addukt **10**. Durch eine säurekatalysierte Methanolyse wurde der *cis*-Diester **11** erhalten, der mit Hilfe einer basenkatalysierten Epimerisierung in den *trans*-Diester **12** umgewandelt werden konnte. Der *trans*-Diester **12** wurde mit Lithiumaluminiumhydrid zum *trans*-Diol **13** reduziert. Im Anschluss konnte das *trans*-Diol **13** mit dem Chlorierungsreagenz Triphenylphosphindichlorid zum *trans*-Dichlorid **14** umgesetzt werden. Der letzte Reaktionsschritt erfolgte durch eine zweifache basische Eliminierung mit einem Überschuss an Kaliumhydroxid und mit katalytischer Zugabe an 18-Krone-6-Ether zum gewünschten Dien **15**.^[41,42,126,127]

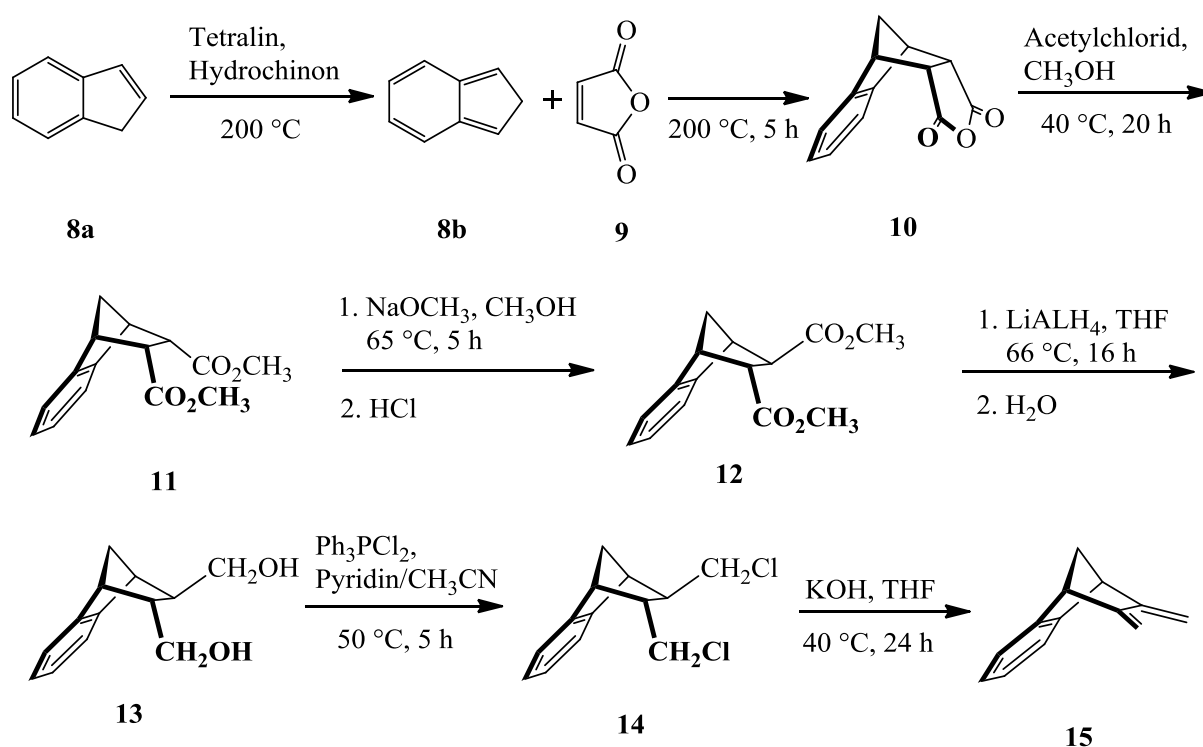


Abbildung 3.2.1.2: Syntheschema der Dien-Seitenwand.

3.2.1.3 Synthese der Diacetoxy-, Dihydroxy und Monohydroxypinzette

Das Pinzettengrundgerüst wird aus der Benzolspacer-Einheit **7** und drei bis vier Moläquivalenten Dien-Seitenarms **15** mit Hilfe einer Diels-Alder-Reaktion aufgebaut. Dieses erfolgte in einer abgeschmolzenen Ampulle, die für vier Tage bei 175 °C thermolysiert wurde.^[40,52] Durch die Zugabe von Triethylamin wurde eine kationische Polymerisation des Diens weitgehend verhindert. Aufgrund der *exo*-Selektivität der Doppelbindung der Norboneneinheit und der *endo*-Selektivität des 1,3-Diensystems von Bisexomethylenbornan und seinen Derivaten entstand ausschließlich das Addukt **16** mit *syn* zueinander ausgerichteten Methylenbrücken.^[128,129] Dieser Schritt ist ausschlaggebend für die konkave Topologie der Pinzette. Die Diacetoxypinzette **17** wurde durch die oxidative Dehydrogenierung mit DDQ erhalten.

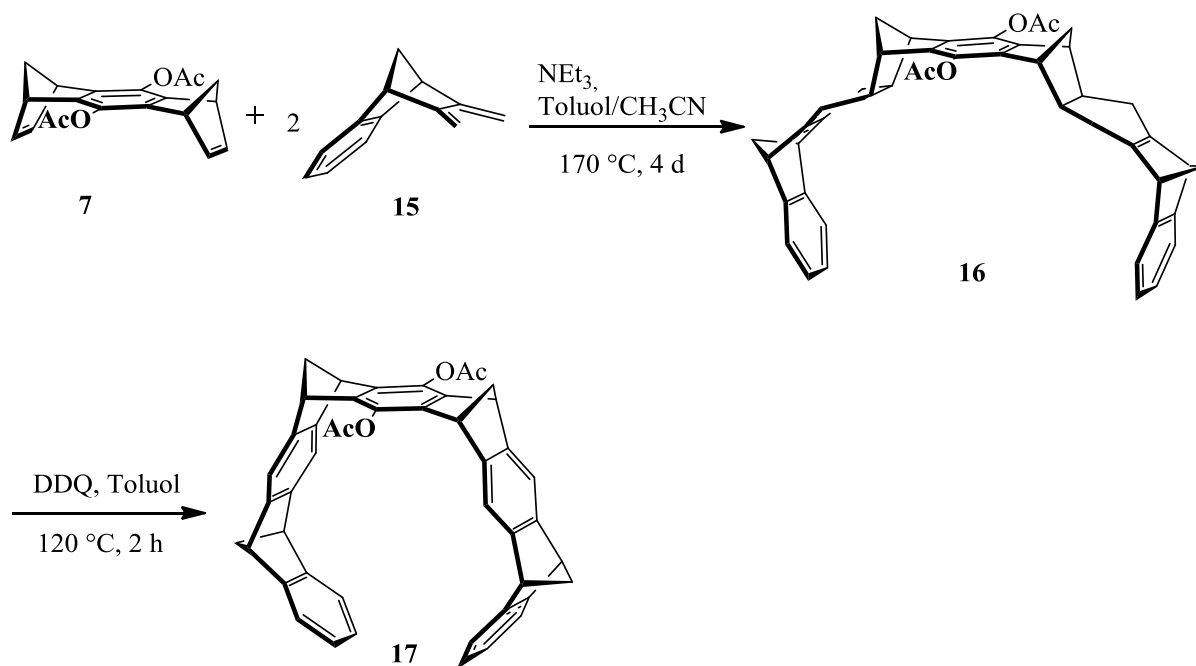


Abbildung 3.2.1.3: Syntheschema der Diacetoxypinzette **17**.

Für die Synthese der Dihydroxypinzette **18** wurde die Diacetoxypinzette **17** mit Lithiumaluminiumhydrid umgesetzt.^[41,52]

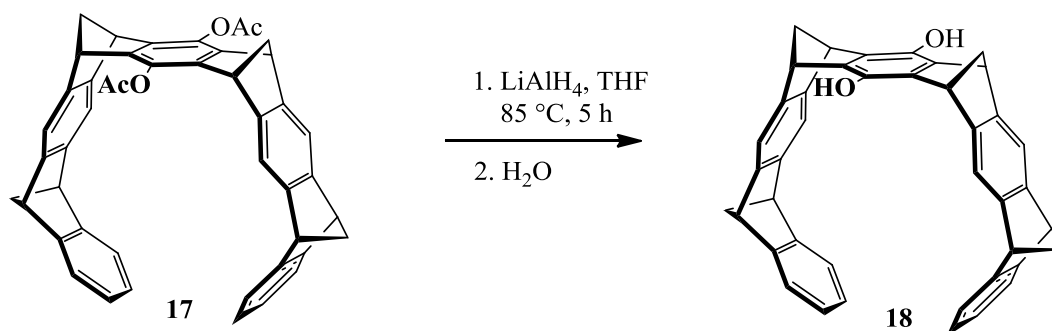


Abbildung 3.2.1.4: Syntheschema der Dihydroxypinzette **18**.

Um die einseitig Acetat-geschützte Monohydroxypinzette **19** zu erhalten, wird an der Diacetoxypinzette (**17**) mit Natronlauge selektiv eine Acetoxygruppe abgespalten.

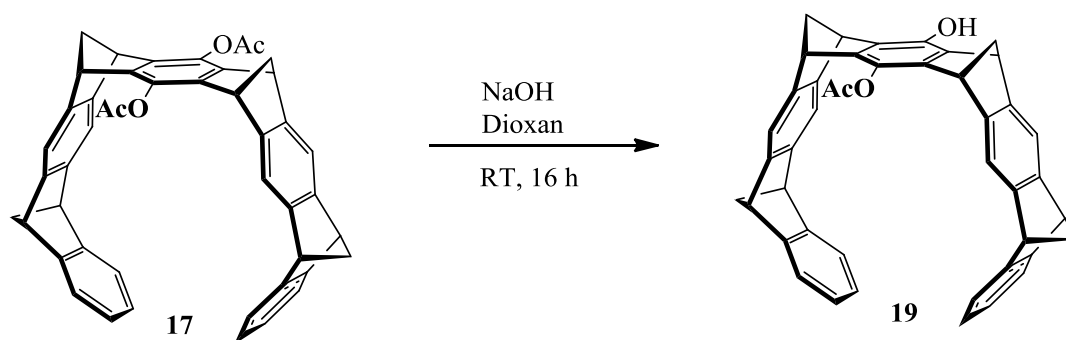


Abbildung 3.2.1.5: Syntheschema der Monohydroxypinzette **19**.

3.2.2 Synthese der Bisphosphatpinzette

Die Synthese der Bisphosphatpinzette setzt sich aus zwei Schritten zusammen.^[54] Zunächst wurden die beiden Hydroxygruppen der Dihydroxypinzette **18** mit Phosphorylchlorid in die Phosphoresterchloride **20** überführt, die umgehend mit Wasser zu der Phosphorsäure **21** hydrolysierten. Um das Natriumsalz **22** zu erhalten, wurden zur Neutralisation vier Moläquivalente Natriumhydroxid-Monohydrat zur Säure zugesetzt.

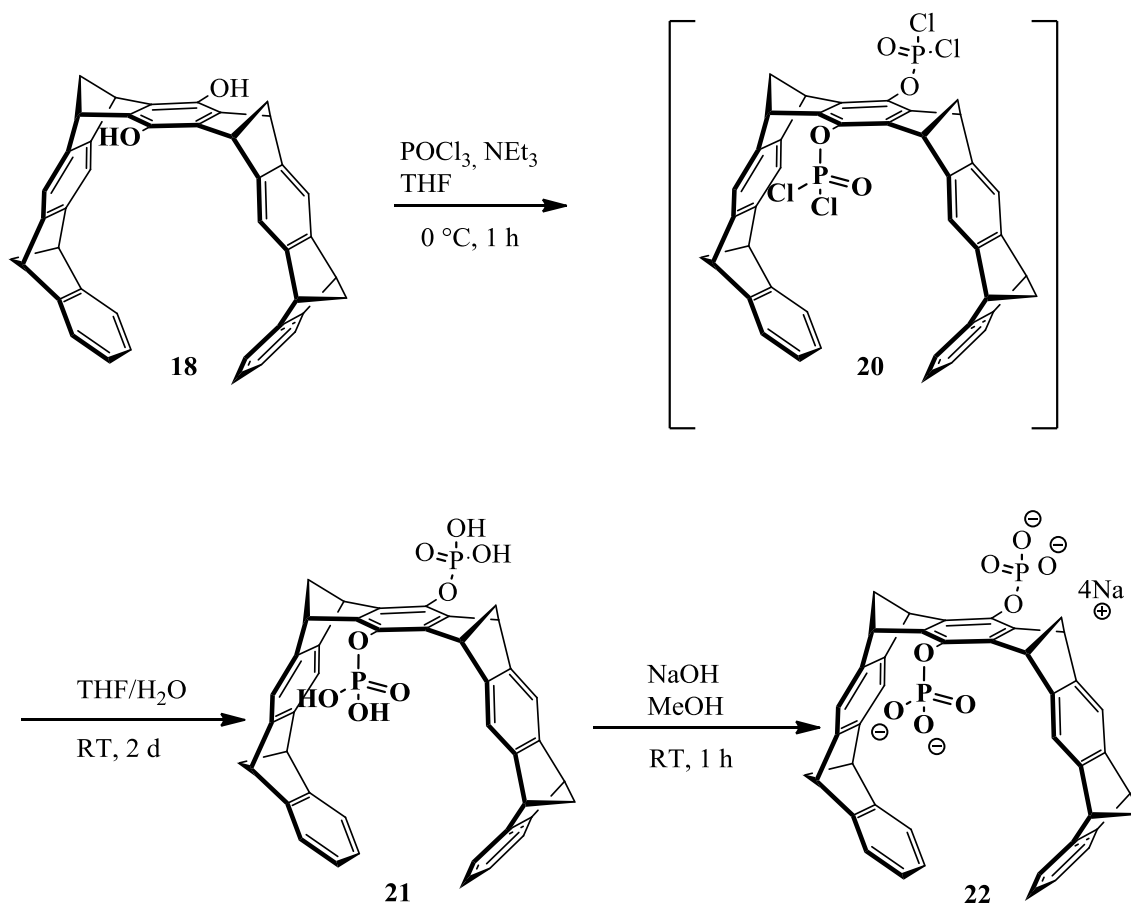


Abbildung 3.2.2.1: Syntheschema der Bisphosphatpinzette **22**.

3.2.3 Synthese der Carboxymethylpinzette

Die Synthese der Carboxymethylpinzette umfasst ausgehend von der Dihydroxypinzette **18** zwei Stufen. Die beiden Hydroxygruppen wurden nukleophil mit Bromessigsäuremethylester unter Finkelsteinbedingungen substituiert und es entstand die methylestergeschützte Carboxymethylpinzette **23**. Der Ester ließ sich durch die Zugabe von zwei Moläquivalenten NaOH-Monohydrat abspalten und es wurde das freie Dinatriumsalz der Carboxymethylpinzette **24** erhalten. Das Syntheschema ist folgend dargestellt.

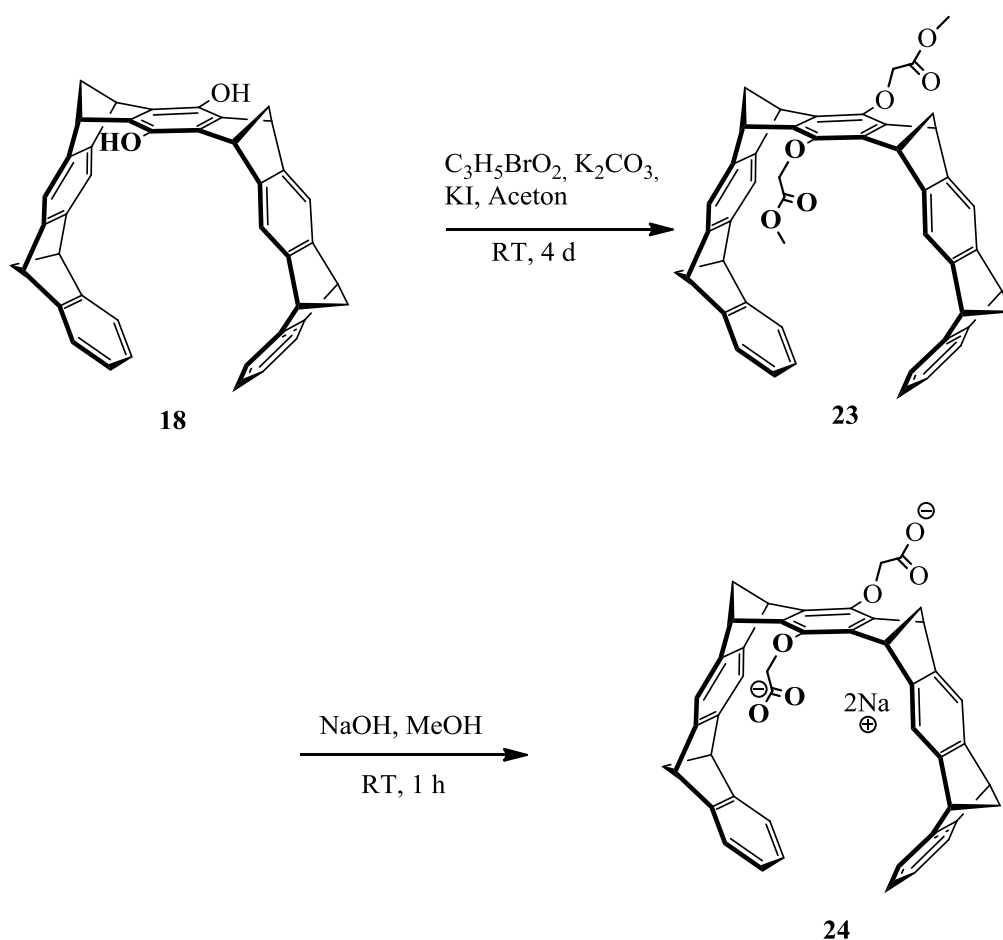


Abbildung 3.2.3.1: Syntheschema der Carboxymethylpinzette **24**.

3.2.4 Synthese der unsymmetrischen Pinzetten

Um die Spezifität der Pinzetten zu erhöhen, wurde eine Reihe von unsymmetrischen Pinzetten entwickelt. Sie unterscheiden sich in der Beschaffenheit eines Linkers oder aber einfach im Aufbau der Anionen. Die Synthese aller unsymmetrischen Pinzetten basiert auf der Monohydroxypinzette **19**.

3.2.4.1 Synthese der Methoxyphosphatpinzette

Im Aufbau unterscheidet sich die Methoxyphosphatpinzette **29** lediglich durch die methylgeschützte Hydroxygruppe von der bereits bekannten und untersuchten Hydroxyphosphatpinzette **41**.^[130] Die Synthese der Methoxyphosphatpinzette beginnt nicht mit der Phosphorylierung der Monohydroxypinzette, sondern mit der Substitution der Hydroxygruppe durch eine Methylgruppe **25**. Dazu wurde die Monohydroxypinzette mit Methyljodid und Kaliumcarbonat als Base an der phenolischen Hydroxygruppe alkyliert. Die Acetoxygruppe wurde durch die basische Aufarbeitung hydrolysiert. Die Monomethoxypinzette **25** wurde anschließend mit Phosphoroxotrichlorid zu dem Methoxyphosphoresterchlorid **26** umgesetzt. Danach ergaben sich zwei verschiedene Aufarbeitungsmöglichkeiten. Es konnte zunächst der Phosphorsäureester **27** gebildet werden, der den Vorteil hätte, dass ein zusätzlicher Aufreinigungsschritt ermöglicht werden würde. Als andere Möglichkeit bestand die wässrige Aufarbeitung zur Phosphorsäure **28**. Bei der Synthese des Phosphorsäureesters stellte sich heraus, dass nicht nur der Ester durch Trimethylsilylbromid abgespalten wurde, sondern auch eine Teilabspaltung des Methylethers auftrat. Zur vollständigen Synthese der Methoxyphosphatpinzette eignete sich somit nur die direkte Syntheseroute über die Phosphorsäure. Diese konnte mit zwei Moläquivalenten NaOH-Monohydrat direkt in das Natriumsalz **29** überführt werden. Die Synthese der Methoxyphosphatpinzette **29** ausgehend von der Monohydroxypinzette **19** wird im folgenden Schema dargestellt.

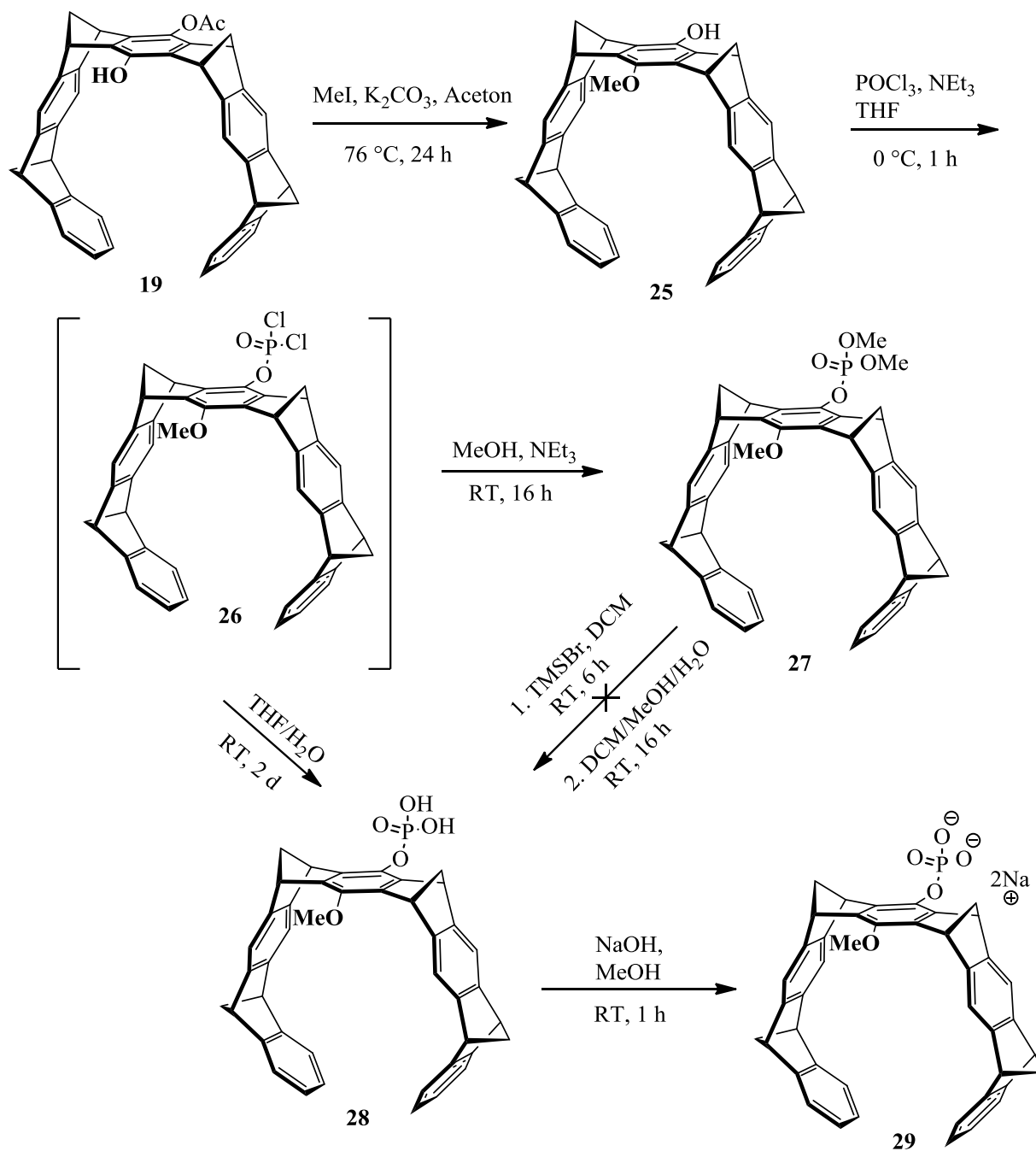


Abbildung 3.2.4.1: Syntheschema der Methoxyphosphatpinzette 29.

3.2.4.2 Synthese der Carboxymethylphosphatpinzette

Als weitere unsymmetrische Pinzette wurde die Carboxymethylphosphatpinzette mit zwei unterschiedlichen Anionen entwickelt. Die Synthese umfasst von der Monohydroxypinzette **19** vier, bzw. fünf Stufen.

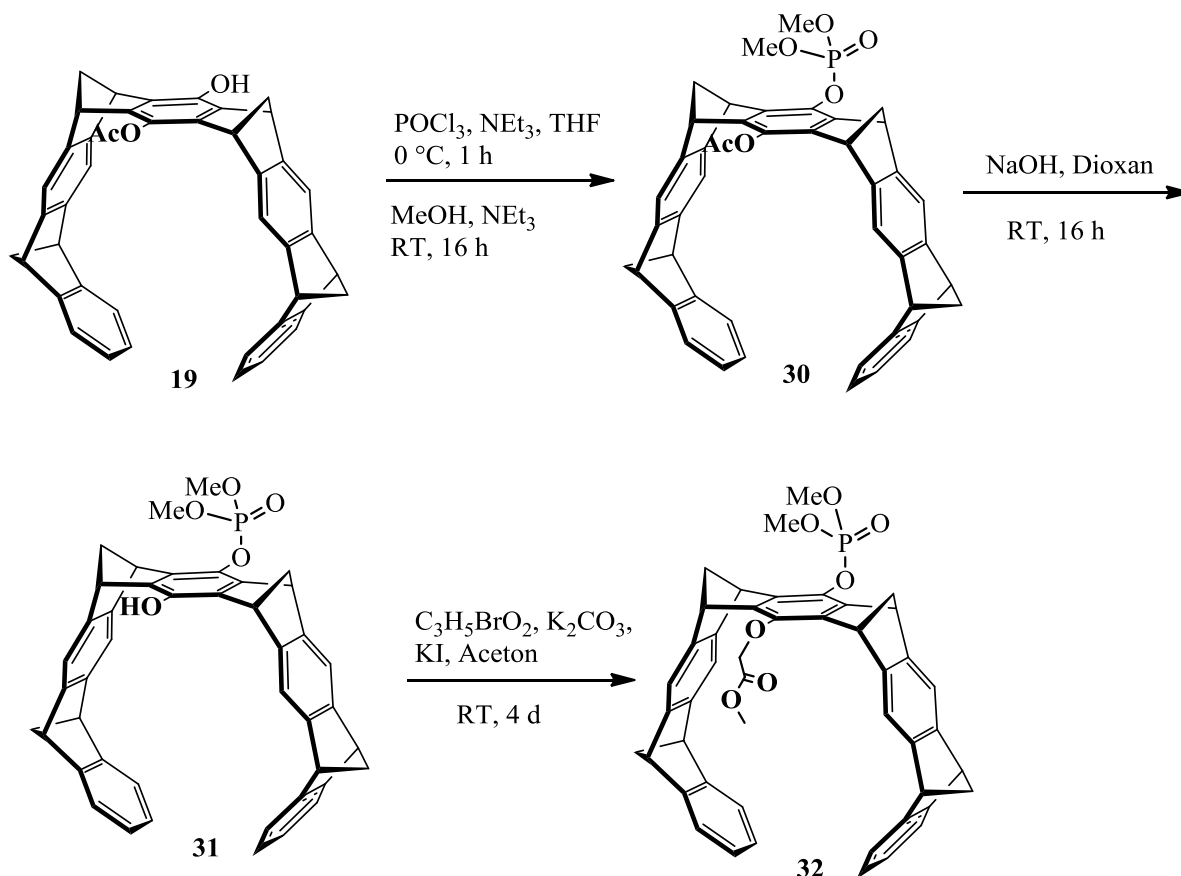


Abbildung 3.2.4.2: Syntheschema der methylgeschützten Carboxymethylphosphatpinzette **32**.

Zunächst wurde die Monohydroxypinzette mit Phosphoroxyltrichlorid und durch die Aufarbeitung mit Methanol in die Methylphosphatpinzette **30** überführt. Nach Entschützung der Acetatgruppe mit 1 M NaOH über Nacht, wurde die Methylphosphatpinzette **31** mit freier Hydroxygruppe erhalten. Die Kupplung des Bromessigsäuremethylesters an **31** erfolgt nach einem $\text{S}_{\text{N}}2$ -Mechanismus mit katalytischer Zugabe von Kaliumiodid und 18-Krone-6-Ether zur methylgeschützten Carboxymethylphosphatpinzette **32**. Zur Darstellung der entschützten Carboxymethylphosphatpinzette wurde die Phosphorsäure mit Trimethylsilylbromid entschützt. Die Zwischenstufe **33** konnte durch Aufarbeitung isoliert oder ohne direkte Aufarbeitung das Natriumsalz der Carboxymethylphosphatpinzette **34** durch die Zugabe von drei Moläquivalenten NaOH-Monohydrat erhalten werden (Abbildung 3.2.4.3).

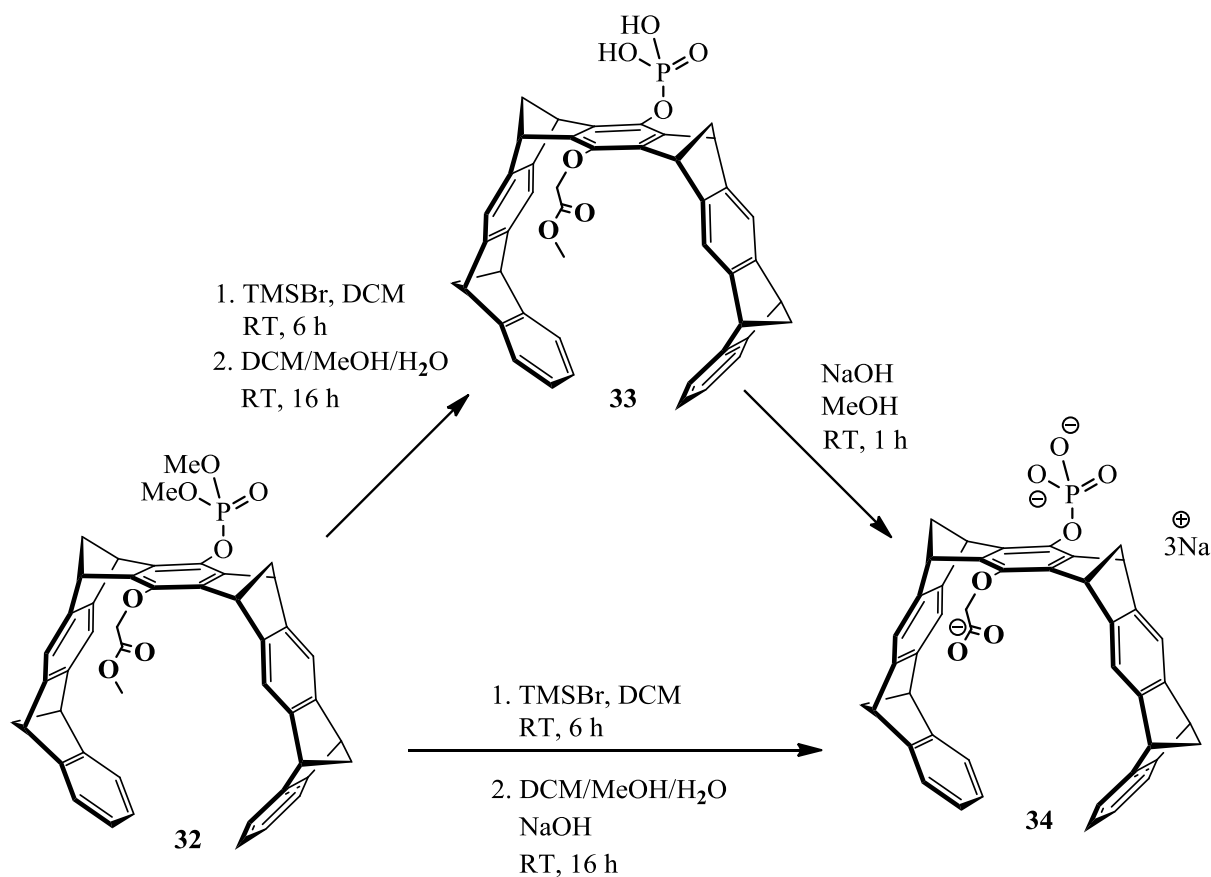


Abbildung 3.2.4.3: Syntheschema des Natriumsalzes der Carboxymethylpinzette **34**.

3.2.4.3 Synthese einer unsymmetrischen Phosphatpinzette mit Glykollinker

Unter dem Gesichtspunkt die Spezifität der Phosphatpinzetten zu erhöhen, wurde eine Synthese entwickelt, bei der ein Glykollinker **37** an die Pinzette angebracht wird. Für die Synthese des Glykollinkers wurde im Gegensatz zur Literatur^[131,132] vier äquivalente Diethylenglykol (**35**) eingesetzt. Dieser reagierte mit Bromessigsäure und Benzylbromid in einer nukleophilen Substitution zum Glykollinker **36**. Um diesen mit der Monophosphatpinzette **19** zu kuppeln, wurde zunächst der Alkohol mit der guten Abgangsgruppe Tosylat unter Bildung von **37** versehen.

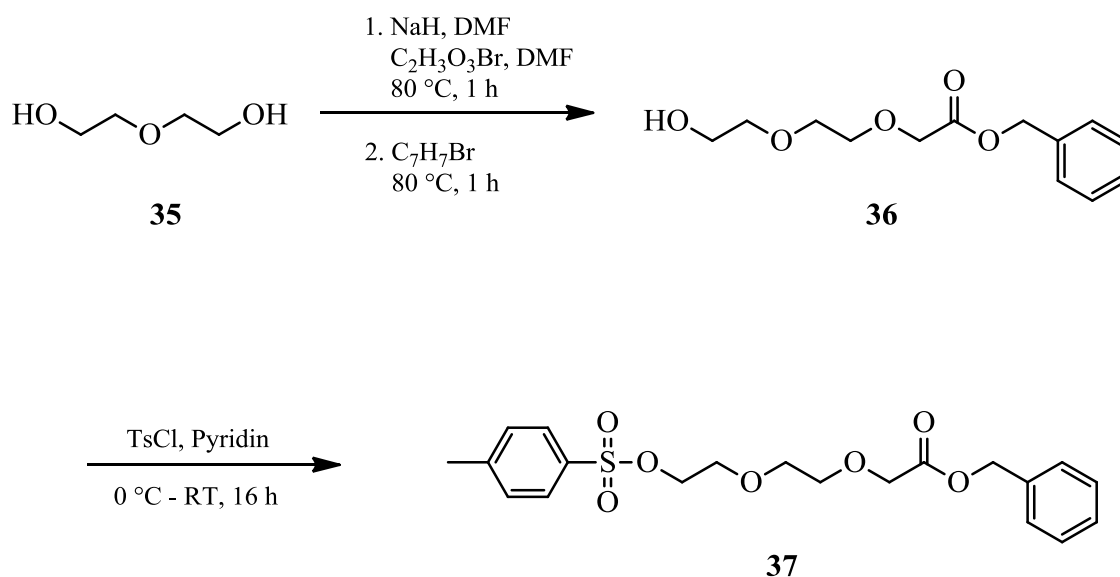


Abbildung 3.2.4.4: Syntheschema des tosylgeschützten Glykollinkers **37**.

Die Kupplung des Glykollinkers **37** erfolgte nach einer $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion unter Finkelsteinbedingungen innerhalb von sechs Tagen bei Raumtemperatur. Die substituierte Pinzette **38** wies trotz mehrmaliger Aufreinigung keine hohe Reinheit auf.

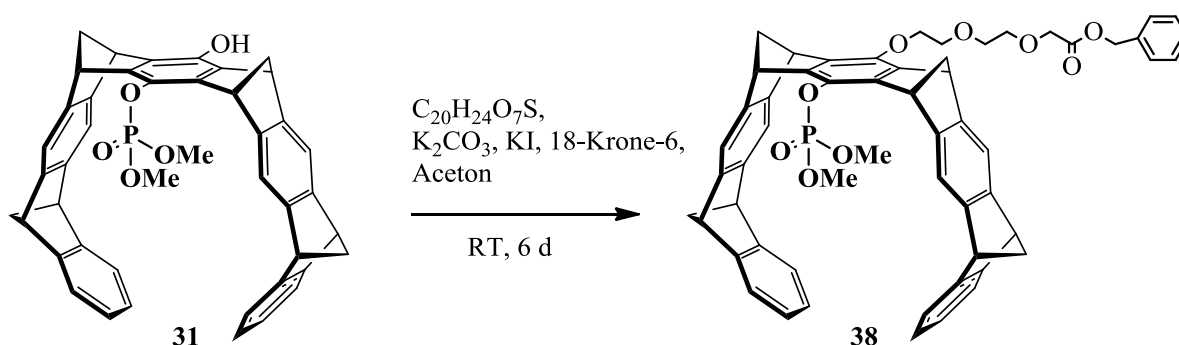


Abbildung 3.2.4.5: Syntheschema der Phosphatpinzette mit Glykollinker.

3.2.4.4 Synthese von substituierten Phosphat-Modellverbindungen

Um die Wasserlöslichkeit der Pinzetten zu gewährleisten, sollte ein Konzept entwickelt werden, bei dem der Linker nicht direkt an der Pinzette gebunden vorliegt, sondern über einen Phosphorester gebunden wird. Um diese Verknüpfung über das Phosphat zu untersuchen, wurden zunächst Synthesen mit dem Spacer als Modellverbindung durchgeführt. Dabei ließen sich zwei substituierte Modellverbindungen herstellen. Diese wurden auf dem Wege der Phosphorylierung zunächst mit ein, bzw. zwei Äquivalenten längerkettigen Alkohol versetzt, der die entstandenen Phosphorsäureesterchloride substituiert. So wird eine Phosphorsäure

erhalten, die ein, bzw. zwei Anionen mit Linkern substituiert hat. Die Synthese dieser Modellverbindungen musste unter absolutem Luft- und Feuchtigkeitsausschluß stattfinden und brachte nur eine geringe Ausbeute. Die Synthese wurde aus diesem Grunde nicht auf die Dihydroxypinzette übertragen.

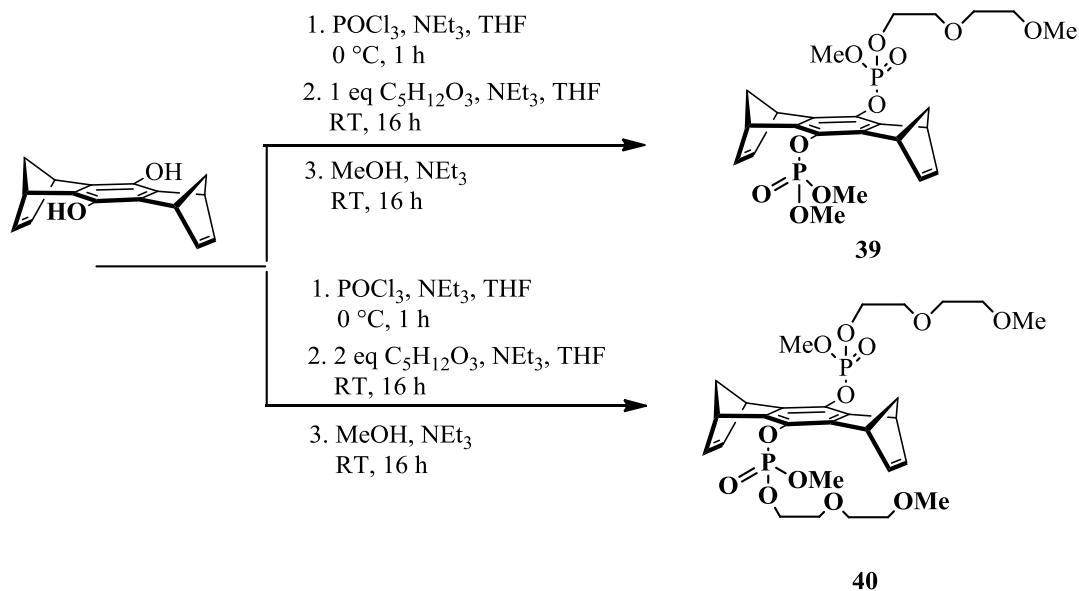


Abbildung 3.2.4.6: Syntheschema der substituierten Phosphat-Modellverbindung.

3.3 Bindungsstudien mit den neuen Pinzetten

3.3.1 Untersuchung der Carboxymethylpinzette 24

Um die molekularen Pinzetten für ein bestimmtes Ziel spezifischer zu gestalten, müssen zunächst die Wechselwirkungen zwischen den molekularen Pinzetten und den Gastmolekülen mit unterschiedlichen Methoden untersucht werden. Dazu wurden als erstes die Selbstassoziationskonstante und die Bindungskonstanten mit verschiedenen Gästen untersucht und mit der bereits bekannten Phosphatpinzette **22** verglichen.

3.3.1.1 Selbstassoziationskonstante der Carboxymethylpinzette 24

Die Selbstassoziation von Rezeptormolekülen beeinträchtigt die Affinität der Rezeptoren mit Gastmolekülen Komplexe einzugehen. Unter optimalen Bedingungen weisen somit gute Rezeptoren eine geringe Eigenassoziation auf. Für die Phosphatpinzette **22** ist eine schwache Selbstassoziation von $K_{\text{dim}} = 60 \mu\text{M}$ in wässriger Lösung bekannt. Für die Carboxymethylpinzette **24** wurde in Phosphatpuffer eine Dimerisierungskonstante von $K_{\text{d}} = 39 \mu\text{M}$ gefunden. Die Selbstassoziationskonstante wurde in einer Verdünnungstitration mittels ^1H -NMR bestimmt.

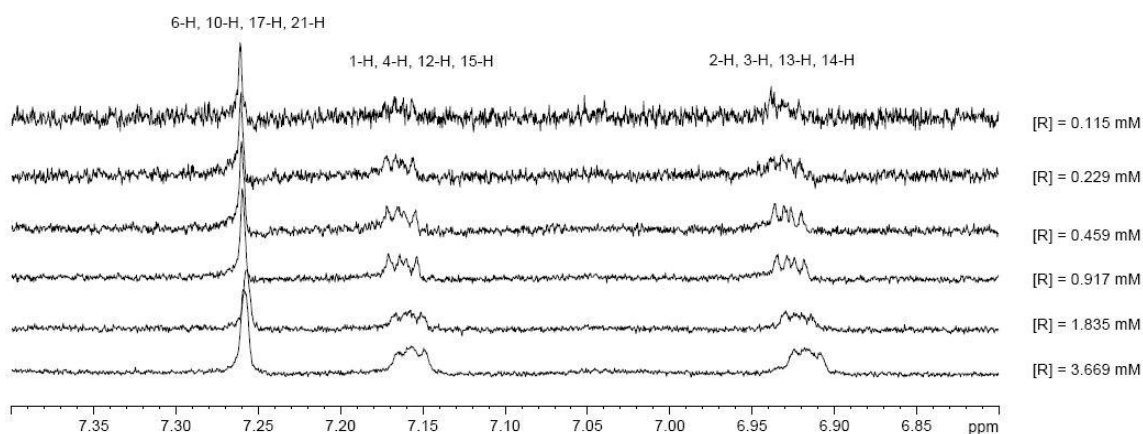
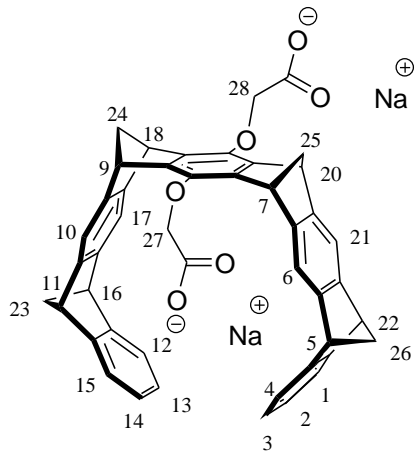


Abbildung 3.3.1.1: Bestimmung der Selbstassoziation von **24** mittels ^1H -NMR-Spektroskopie.

Anhand der minimalen Verschiebung der aromatischen Protonen ist schon von einer geringen Selbstassoziation auszugehen. Für die Protonen 2-H, 3-H, 13-H und 14-H ergibt sich eine maximale Verschiebung von $\Delta\delta_{\text{max}} = 0.083 \text{ ppm}$. Die ermittelten Daten der übrigen Protonen

und die Assoziationskonstante mit Fehler sind mit der Gleichung (3) berechnet worden und in Tabelle 3.3.1.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.3.1.1: Dimerisierungskonstante und maximale chemische Verschiebung von **24**.

Rezeptor	$K_{\text{dim}} [\text{M}^{-1}]$	$\Delta\delta_{\text{max}} [\text{ppm}]$
	$39 \pm 60\%$	<p>0.083 (2-H, 3-H, 13-H, 14-H),</p> <p>0.025 (1-H, 4-H, 12-H, 15-H),</p> <p>0.005 (6-H, 10-H, 17-H, 21-H),</p>

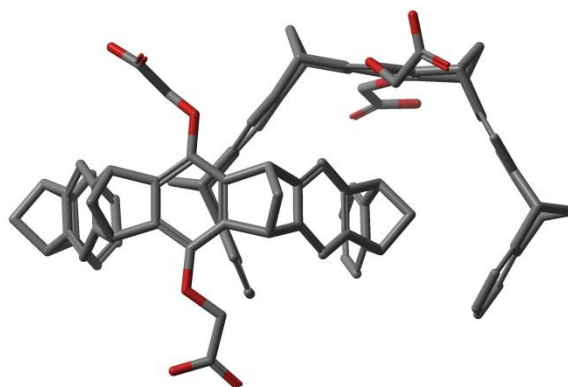
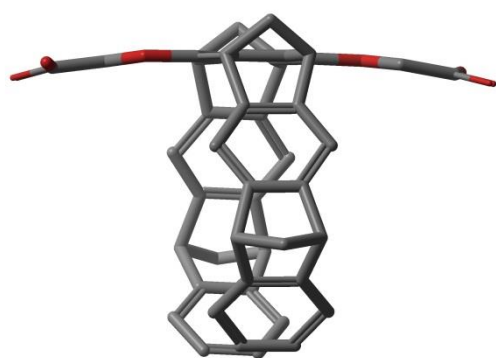


Abbildung 3.3.1.2: Molecular Modeling Struktur von **24**. Links: Ermittelte räumliche Struktur von **24**. Rechts: Ermitteltes Dimer von **24** (Macro Modal 9.2, OPLS_2005, Wasser, 5000 Schritte).^[29]

Bei der Betrachtung der Molecular Modeling Struktur der Carboxymethylpinzette **24** fällt auf, dass die Carboxymethylgruppen nicht hoch und auch nicht runter orientiert sind. Sie lassen somit die Kavität der Pinzette offen. Eine Selbstassoziation könnte jedoch ausgeschlossen werden durch die längere und flexiblere Carboxymethylgruppe, die eventuell einen sterischen Effekt auf die Kavität und somit auch auf die Dimerisierung der Pinzette hat.

3.3.1.2 Bindungsstudien der Carboxymethylpinzette **24** mit verschiedenen Gastmolekülen

Ein wichtiger Faktor für die Assoziation von zwei oder mehreren verschiedenartigen Molekülen ist die Assoziationskonstante (K_a) oder ihr reziproker Wert, die Dissoziationskonstante (K_d). Die Assoziationskonstante zeigt die Stärke einer Komplexbildung eines Wirt-Gast-Systems, beruhend auf nicht kovalenten intermolekularen Wechselwirkungen.

Es wurden die Assoziationskonstante, bzw. Dissoziationskonstante der Carboxymethylpinzette mit den Aminosäuren Ac-Lys-OMe und Ac-Arg-OMe mittels ^1H -NMR-Titration bestimmt. Die ermittelten Konstanten und die maximalen chemischen Verschiebungen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 3.3.1.2: Dissoziationskonstanten und maximale chemische Verschiebung von **24** mit zwei verschiedenen Gastmolekülen.

Gast	$\Delta\delta_{\text{max}}$ [ppm]	K_d [μM]
Ac-Lys-OMe	6-H = 0.936, 5-H = 0.540, 4-H = 0.395, 3b-H = 0.774, 3a-H = 0.518	$1164 \pm 11\%$
Ac-Arg-OMe	5-H = 0.961, 4b-H = 0.619, 4a-H = 0.479, 3-H = 0.521	$1393 \pm 18\%$

Die maximale chemische Verschiebung der Protonen der Aminosäureseitenkette fällt gering aus. Dies lässt auf eine schlechte Bindung dieser in der Kavität der Carboxymethylpinzette **24** schließen und es errechnet sich somit eine hohe Dissoziationskonstante. Die Spektren der Titration sind in Abbildung 3.3.1.3 und in Abbildung 3.3.1.4 dargestellt.

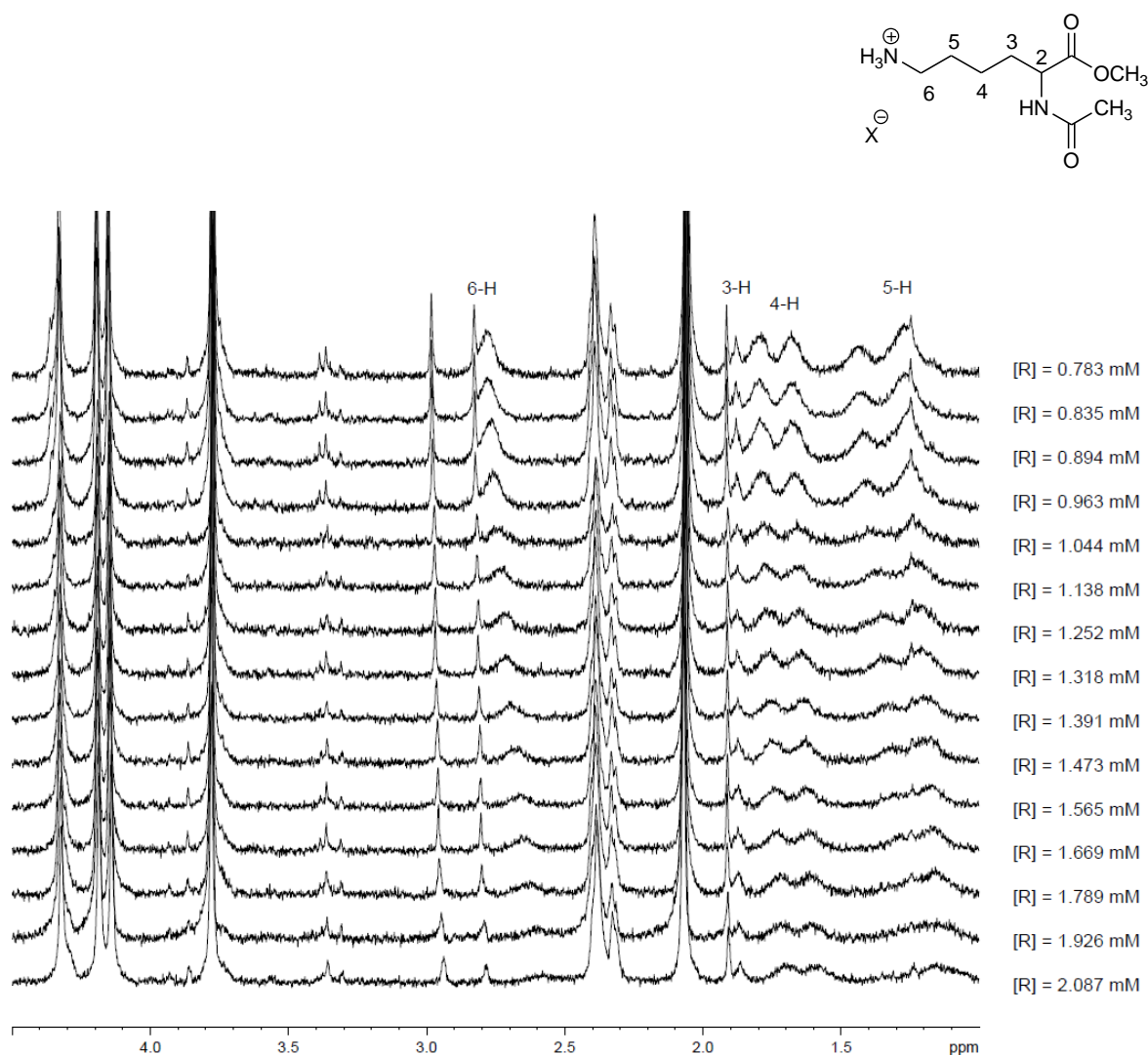


Abbildung 3.3.1.3: ^1H -NMR-Titration von **24** mit Ac-Lys-OMe.

Es ist deutlich nur eine geringe Verschiebung der Protonen zu sehen. Dies lässt darauf schließen, dass nur eine geringe Interaktion zwischen dem Lysinderivat und der Pinzette **24** auftritt oder aber eine schnelle Komplexierung und Dekomplexierung vorliegt. Bei der Titration mit dem Argininderivat sind auch nur geringe Verschiebungen der Protonen zu sehen. Das weist auch wieder auf eine geringe Bindungsaffinität von **24** zu der Aminosäure hin.

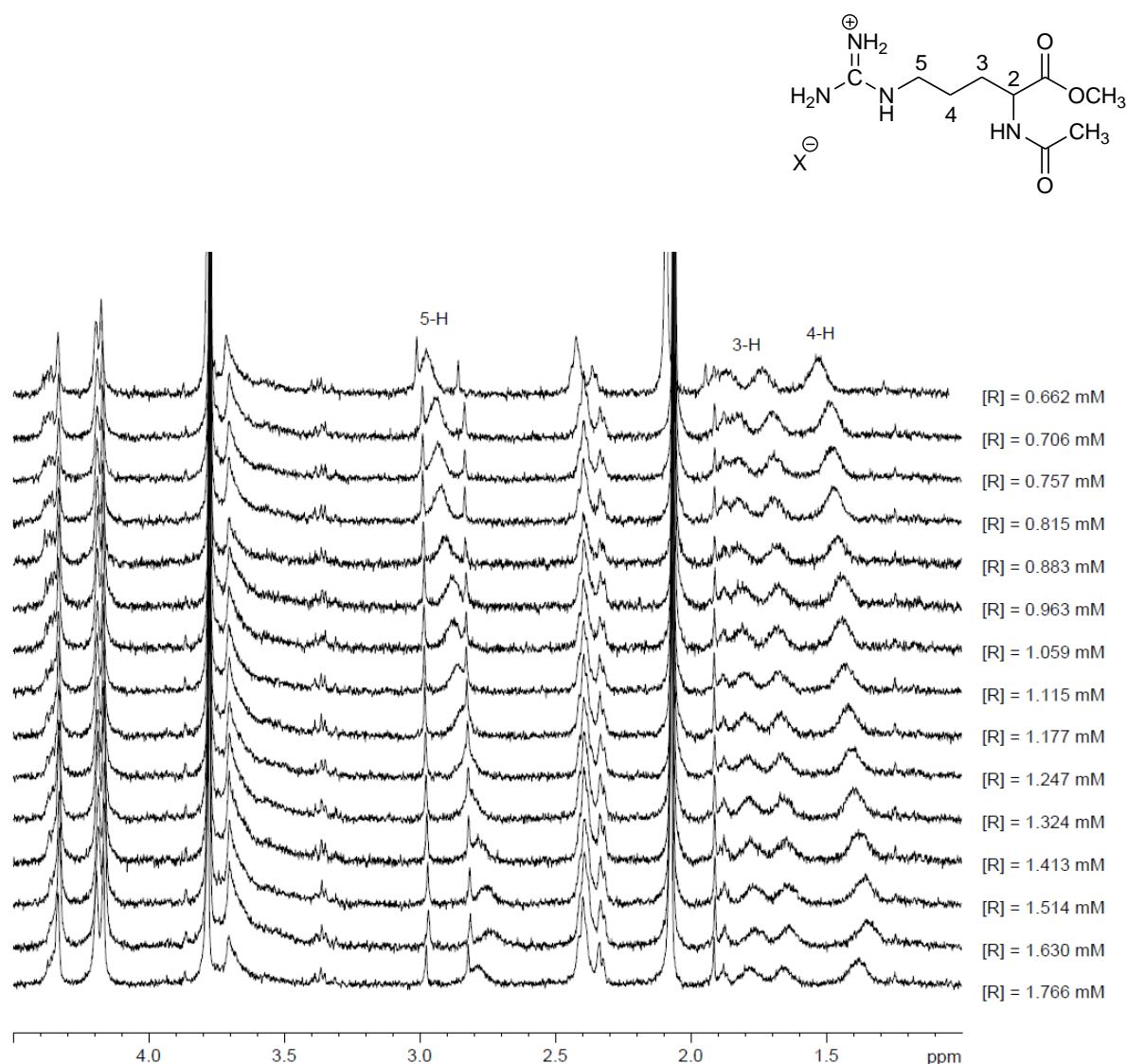


Abbildung 3.3.1.4: ^1H -NMR-Titration von **24** mit Ac-Arg-OMe.

Im Vergleich zu der bereits bekannten und untersuchten Phosphatpinzette, die eine Dissoziationskonstante von $17\ \mu\text{M}$ mit Ac-Lys-OMe (ermittelt mit ^1H -NMR-Titration) und eine maximale chemische Verschiebung von $3.91\ \text{ppm}$ (6-H) aufweist, zeigt die Carboxymethylpinzette eine geringe Bindungsaffinität. Die Bestimmung der Assoziations-, bzw. Dissoziationskonstanten mittels Fluoreszenztitration bestätigen die durch die ^1H -NMR-Titration ermittelte schwache Bindung. Die Ergebnisse der Titrations sind in Tabelle 3.3.1.3 zusammengefasst. Die jeweiligen Assoziationskonstanten, bzw. die Dissoziationskonstanten als reziproker Wert, wurden nach der Gleichung (1) berechnet.

Tabelle 3.3.1.3: Übersicht der Dissoziationskonstanten von **24** und **22**, gemessen mit Fluoreszenztitration.
a: Phosphatpuffer 200 mM, pH 7.6, b: Phosphatpuffer 10 mM pH 7.2, n.a.: nicht auswertbar.

Gast	24 K_d [μ M]	22 K_d [μ M] ^[20]
Ac-Lys-OMe	$226 \pm 14\%^a$	$17 \pm 6\%^a$
Ac-Arg-OMe	$880 \pm 26\%^a$	$60 \pm 2\%^a$
Ac-Lys-OMe	$643 \pm 7\%^b$	$9 \pm 6\%^b$
Ac-Arg-OMe	$281 \pm 18\%^b$	$20 \pm 5\%^b$
H-Lys-OH	$1170 \pm 20\%^b$	$21 \pm 4\%^a$
H-Arg-OH	$609 \pm 27\%^b$	
KAA	$33333 \pm 83\%^b$	$30 \pm 3\%^b$
KLVFF	n.a. ^b	$20 \pm 5\%^b$
1,8-Diaminooctan · HCl	$202 \pm 20\%^b$	

Die Fluoreszenztitrationen bestätigen die schwache Affinität der Carboxymethylpinzette die Aminosäuren Arginin und Lysin, ihre Derivate und die Lysinhaltigen Peptide KAA und KLVFF zu binden. Man sieht an den abgebildeten Fluoreszenzkurven für die geschützten Lysin- und Argininderivate bei einem 10 mM Phosphatpuffer, dass die Senkung der Pinzettenfluoreszenz durch Zugabe von den Aminosäuren relativ schwach ist. Die daraus resultierenden Bindungskurven zeigen auch nur eine schwache Steigung. Es ist allerdings deutlich zu erkennen, dass die Bindungsaffinität zum Lysin höher als zum Arginin ist.

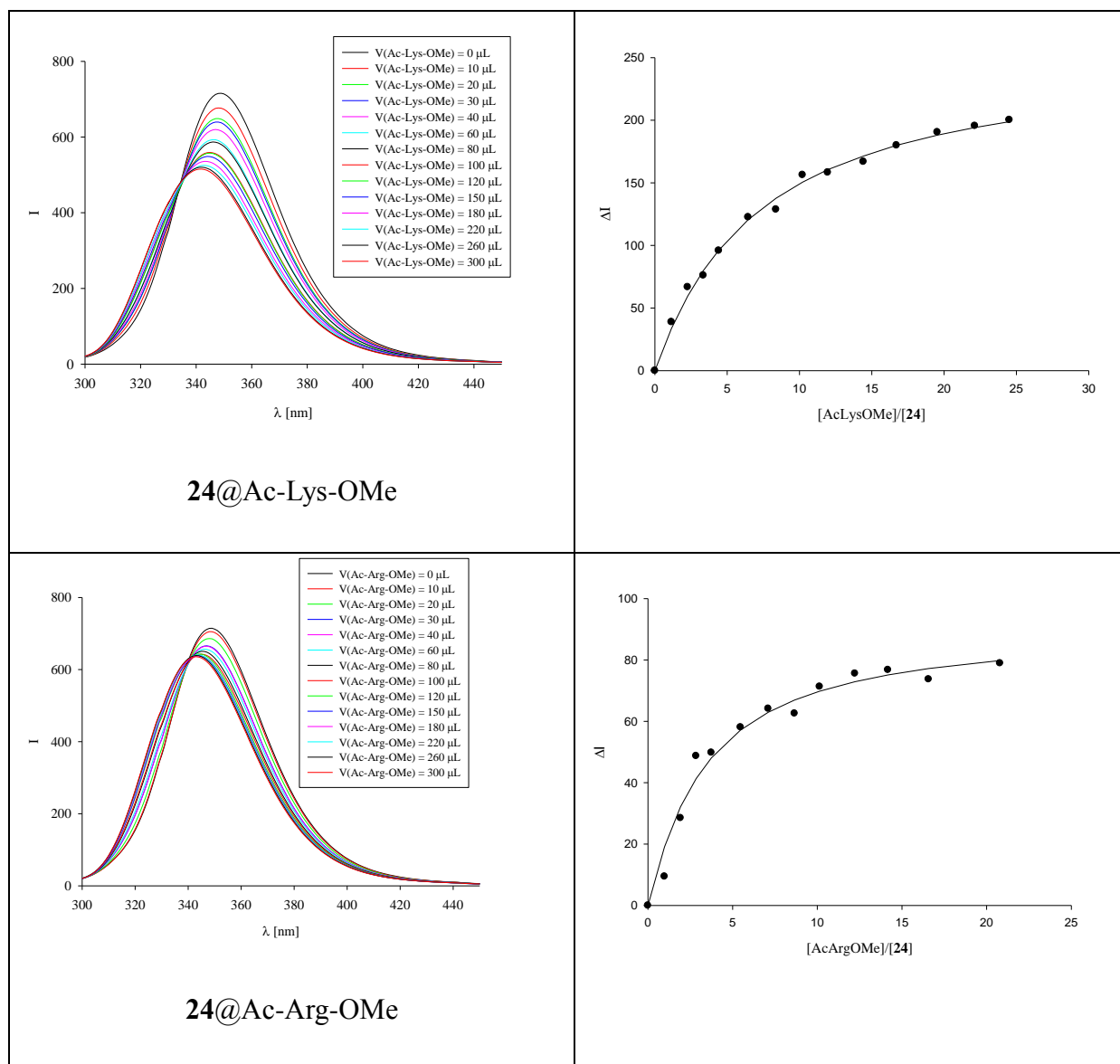


Abbildung 3.3.1.5: Fluoreszenztitrationskurven und die daraus resultierende Bindungskurve von **24** mit Ac-Lys-OMe (oben) und **24** mit Ac-Arg-OMe (unten).

Um einen genauen Überblick über die vorliegende Bindung zu erhalten, die laut den unterschiedlichen Messmethoden schwach ist, wurden Molecular Modeling Strukturen berechnet.

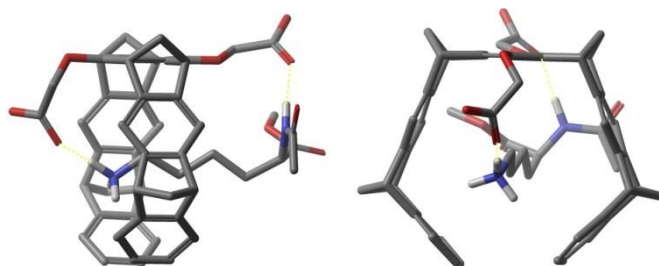
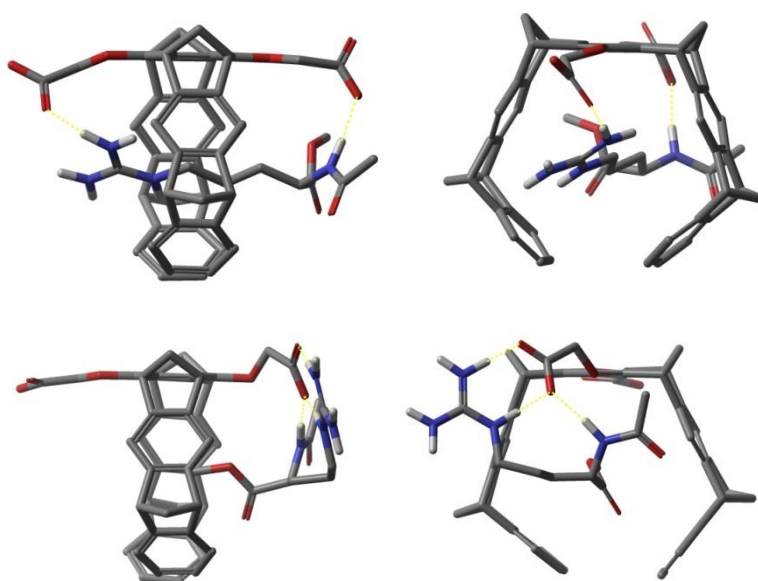
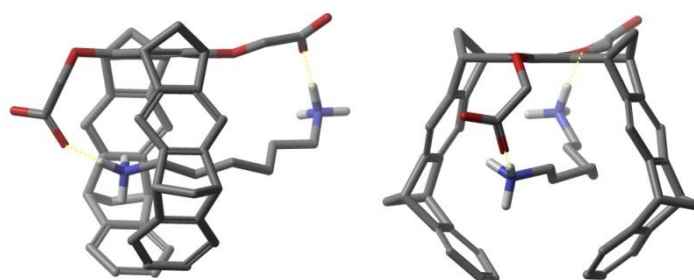
**24@Ac-Lys-OMe****24@Ac-Arg-OMe****24@1,8-Diaminooctan**

Abbildung 3.3.1.6: Molecular Modeling Strukturen der Carboxylatpinzette **24**. Oben: Komplex mit Ac-Lys-OMe, Mitte: Beide möglichen Komplexe mit Ac-Arg-OMe (beidseitige Wasserstoffbrückenbindung und einseitige Wasserstoffbrückenbindung), Unten: Komplex mit 1,8-Diaminooctan (Macro Modal 9.2, OPLS_2005, Wasser, 5000 Schritte).

Die Modeling-Strukturen von **24** mit Ac-Lys-OMe und Ac-Arg-OMe zeigen, dass auch Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden können. Es sind somit nicht nur die hydrophobe Wechselwirkungen, die den Gast in der Kavität halten. Zudem lassen sich Modeling-Strukturen für den Komplex von **24** mit Ac-Arg-OMe ermittelt, bei der durch die Wasserstoffbrückenbindung des Guanidiniumions mit dem Carboxylat der Gast aus der Kavität gezogen wird. Die große Differenz zwischen der Bindungsaffinität der Carboxymethylpinzette zu der Bisphosphatpinzette könnte folglich nur in der Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen begründet liegen, da die hydrophoben Wechselwirkungen der Kavität einen ähnlich großen Faktor besitzen muss. Ferner könnte eine schwächere Bindung von **24** ausgebildet werden, da die Anionen der Carboxymethylgruppe weiter von der Kavität entfernt liegen. Um dies genauer zu untersuchen wurde eine Titration mit dem 1,8-Diaminooctan-hydrochlorid durchgeführt. Die Bindung zu diesem Dikation ist jedoch nur minimal stärker als zu dem geschützten Lysinderivat. Folglich ist nicht die Länge des Anions ausschlaggebend, sondern die Stärke der Wasserstoffbrückenbindung, die zwischen dem Carboxylat und dem Ammoniumion ausgebildet wird. Um weitere Erkenntnisse über diese Komplexbildung zu erhalten, wurden mikrokolorimetrische Untersuchungen durchgeführt. Für die Komplexe von den geschützten Lysin- und Argininderivaten mit **24** ergeben sich nach der Gleichung (11) folgende thermodynamische Daten:

Tabelle 3.3.1.4: Bindungskonstanten und thermodynamische Daten der Komplexe von **24** mit den geschützten Lysin- und Argininderivaten mittels ITC Messungen.

	K_d [μ M]	n	ΔH [kcal/mol]	$-T\Delta S$ [kcal/mol]	ΔG [kcal/mol]
24@Ac-Lys-OMe	$1385 \pm 94\%$	0.373	-1.985	-1.914	-3.899
24@Ac-Arg-OMe	$1289 \pm 40\%$	0.974	-1.074	-2.869	-3.943

Die thermodynamischen Daten zeigen eine geringe freie Energie des Komplexes mit einer positiven Entropie. Die daraus resultierende Gibbs-Energie spricht für einen exergonisch ablaufenden Prozess, der bei allen Temperaturen abläuft. Die ermittelte Bindungskonstante liegt im Rahmen, der mit ^1H -NMR Titrations bestimmten Bindungskonstante. Die Bildung des Komplexes sollte folglich spontan verlaufen können.

Werden nun noch einmal die Modeling Strukturen betrachtet, so ist zu erkennen, dass das Lysin- sowie das Argininderivat nur durch die Wasserstoffbrückenbindungen in der Kavität stabilisiert werden. Eine weitere Modeling Struktur zeigt jedoch die Aminosäure außerhalb der Kavität, komplexiert durch Wasserstoffbrückenbindungen. Sie weisen nur eine geringe Energiedifferenz zu den Strukturen auf, bei denen der Gast sich in der Kavität befindet. Durch die minimale Verschiebung der Protonensignale im ^1H -NMR ist aber davon auszugehen, dass das Lysin sich teilweise in der Kavität, aber auch oberhalb der Pinzette befinden kann. Die Bindung innerhalb der Kavität ist entweder nicht stark genug, um den Gast dort zu halten oder die Carboxylatgruppe beeinträchtigt die Bindung des Gastes in der Kavität aufgrund sterischer Hinderung. Die Struktur für **24** mit 1,8-Diaminooctan zeigt eine beidseitige Wasserstoffbrückenbindung. Die ermittelte schwache Bindungskonstante kann nur darauf zurückzuführen sein, dass lediglich zwei Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden und die elektrostatischen Wechselwirkungen, die bei den Aminosäuren durch die eigene Carboxylatgruppe hervorgerufen werden, nicht vorhanden sind. Die Bindungsaffinität dieses Komplexes beruht also lediglich auf die hydrophoben Wechselwirkungen der Alkylkette mit der Kavität und der zwei Wasserstoffbrückenbindungen des Diaminkations mit den Carboxylatanionen. Es lässt sich somit festhalten, dass die Bindungsaffinität der Pinzette durch die Verlängerung der Alkylkette des Gastes verbessert wurde. Daraus folgt, dass die Länge der Carboxylatanionen doch eine Rolle spielen muss. Ferner muss die Säurestärke des Anions betrachtet werden. Die Säurestärke des Carboxylations ist im Gegensatz zum Phosphation geringer. Durch die Verteilung der Elektronen ergibt sich für die beiden Anionen eine unterschiedliche Möglichkeit elektrostatische Wechselwirkungen einzugehen.

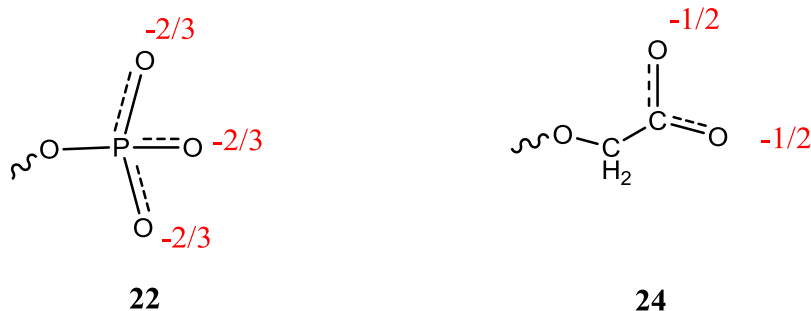


Abbildung 3.3.1.7: Partialladungen der Anionen von **22** und **24**.

Die elektrostatischen Wechselwirkungen scheinen also einen großen Faktor bei der Bindungsaffinität zu liefern. Aber nicht allein diese Wechselwirkungen entscheiden über eine hohe Bindungskonstante. Es ist davon auszugehen, dass auch die Möglichkeit der jeweiligen

Anionen als Elektronendonator zu fungieren, entscheidend für die Bindungsaffinität ist. Bei einem neutralen pH -Wert von 7.2 liegt das Phosphat von **22** deprotoniert, wie aber auch protoniert vor. Das Phosphation ist somit in der Lage Elektronendonator, wie auch als Protonendonator zu agieren. Das Phosphat ist somit in der Lage mit den basischen, wie auch sauren Bestandteilen der Aminosäuren Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. Dies wird auch ausschlaggebend sein für die hohe Bindungsaffinität dieser Pinzette. Dieser Unterschied zu den Pinzetten mit anderen Anionen, wie Carboxymethylpinzette **24** sollte noch weiter untersucht werden.

Zusammenfassend schirmt das Carboxylat der Carboxymethylpinzette **24** die Kavität ab. Durch die Untersuchungen mit 1,8-Diaminooctan als längeres Lysinderivat, stellt sich heraus, dass nach Monte-Carlo Simulationen beide Carboxylate Wasserstoffbrückenbindungen ausüben, jedoch die Bindungsaffinität nur geringfügig erhöht wurde. Ausschlaggebend für die wesentlich höhere Bindungsaffinität der Phosphatpinzette **22** scheint somit die Phosphatgruppe zu sein.

3.3.2 Untersuchungen der Methoxyphosphatpinzette 29

Die Methoxyphosphatpinzette ermöglicht den direkten Vergleich der Auswirkung einer an dem Sauerstoff der Spacereinheit gebundenen Alkylgruppe zu einer Hydroxy- (**41**) oder einer Phosphatgruppe **22**. In einer vorherigen Arbeit wurde die Dimethoxypinzette untersucht, die die Kavität mittels der Methoxygruppen für Gäste abschirmt.^[133] Da die Monophosphatpinzette **41** eine hohe Bindungsaffinität zu C-terminusgeschützten Lysin- und Argininderivate aufweist^[130], sollte ermittelt werden, inwieweit eine Ethersubstitution Auswirkungen auf die Bindungsaffinität hat. Dazu werden die Fluoreszenztitrations von **29** mit der Monophosphatpinzette **41** verglichen und die Ergebnisse durch Molecular Modeling Strukturen unterstützt.

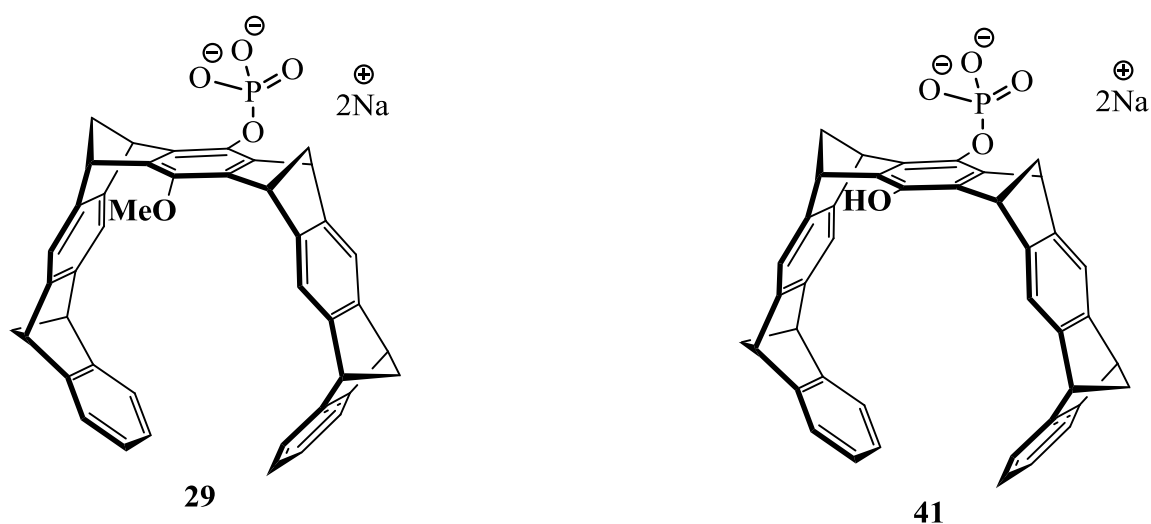


Abbildung 3.3.2.1: Methoxyphosphatpinzette **29** und Monophosphatpinzette **41**.

Für die beidseitig und einseitig geschützten Lysin- und Argininderivate sind die Fluoreszenzspektren und die dazugehörigen Bindungskurven in folgender Übersicht zusammengefasst. Es ist ein deutlicher Unterschied zwischen dem Absinken der Fluoreszenz der Pinzette bei der Zugabe von den Lysinderivaten im Vergleich zu den Argininderivaten zu erkennen. Die dazu ermittelten Bindungskurven lassen bei den Lysinderivaten auf eine hohe Bindungsaffinität schließen.

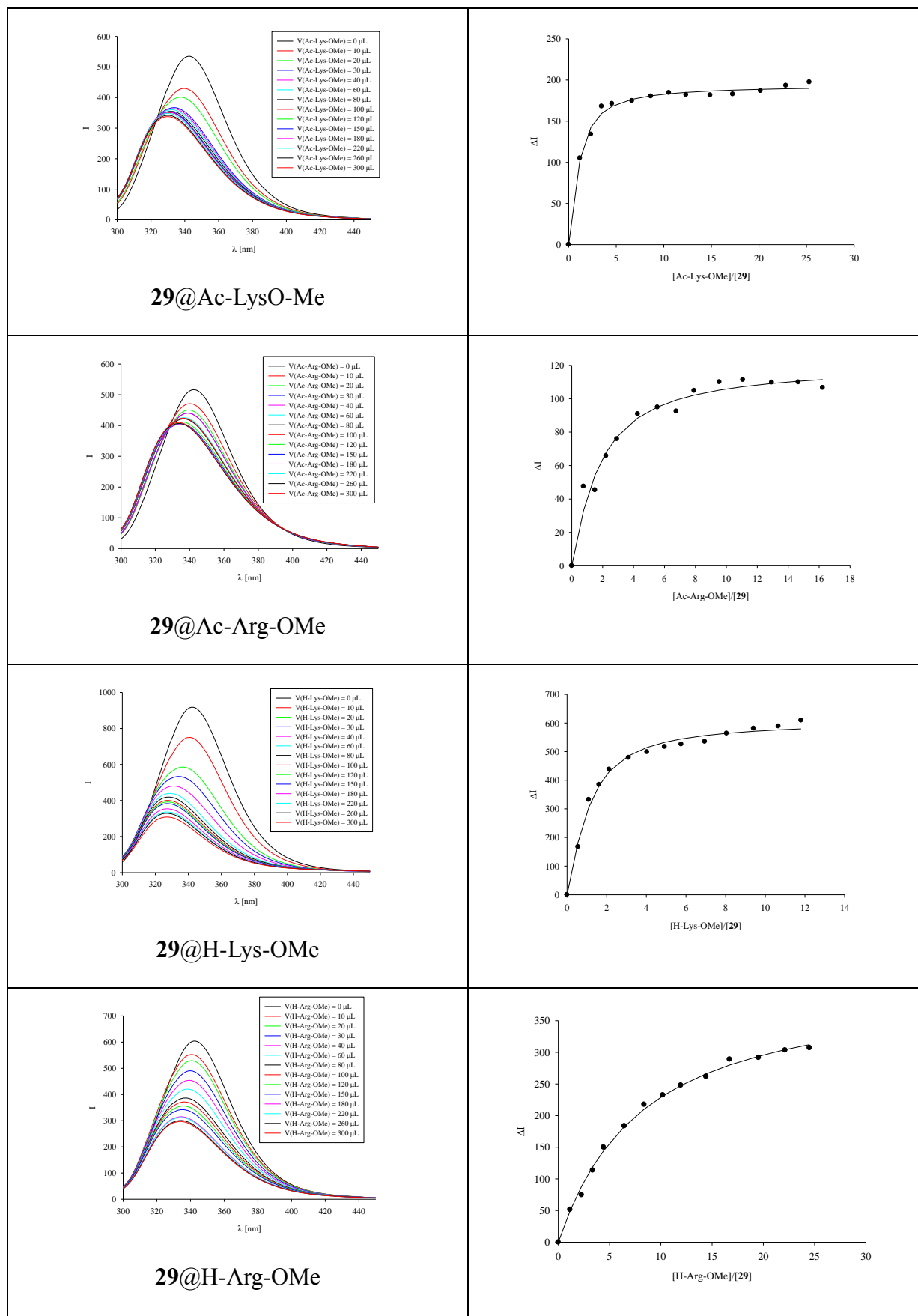


Abbildung 3.3.2.2: Fluoreszenz- und Bindungskurven von **29** mit Ac-Lys-OMe, Ac-Arg-OMe, H-Lys-OMe und H-Arg-OMe.

Die Dissoziationskonstanten von **29** mit den Aminosäuren Arginin und Lysin und deren Derivate wurden ausschließlich mittels Fluoreszenztitration ermittelt. Die folgende Tabelle 3.3.2.1 enthält einen Überblick über die nach Gleichung (1) ermittelten Dissoziationskonstanten und im Vergleich die bereits ermittelten Dissoziationskonstanten von **41**.

Tabelle 3.3.2.1: Übersicht über die Dissoziationskonstanten von **29** und **41**.

Gast	29 K_d [μ M]	41 K_d [μ M] ^[130]
Ac-Lys-OMe	42 ± 11%	266 ± 23%
Ac-Arg-OMe	116 ± 18%	112 ± 18%
H-Lys-OMe	43 ± 12%	15 ± 5%
H-Arg-OMe	437 ± 6%	14 ± 5%
H-Lys-OH	806 ± 14%	154 ± 9%
H-Arg-OH	839 ± 14%	266 ± 23%
KAA	691 ± 26%	
KLFFF	423 ± 47%	

Im Vergleich der beiden Pinzetten sieht man, dass sie sich in Bezug auf die Komplexbildung von der *N/C*-Terminus geschützten Aminosäure Arginin ähnlich verhalten. Bei dem *N/C*-Terminus geschütztem Lysin zeigt die Methoxyphosphatpinzette **29** jedoch eine höhere Bindungsaffinität, die in der gleichen Größenordnung liegt, wie das nur einseitig geschützte Lysin. Für das einseitig geschützte Arginin weist **29** jedoch eine geringe Bindungsaffinität auf. Diese Unterschiede müssen sich auf die Art der Komplexbildung begründen, die mittels Molecular Modeling genauer untersucht werden sollten. Beide Pinzetten (**29** und **41**) binden jedoch schlechter als die Bisphosphatpinzette (Tabelle 3.3.1.3). Die Monophosphatpinzette **41** zeigt einen signifikanten Unterschied im Bindungsverhalten zu der Bisphosphatpinzette **22**, wenn das Arginin- und das Lysinderivat nur am *C*-Terminus geschützt vorliegen. Bei der Ermittlung einer Molecular Modeling-Struktur von **41** wurde zusätzlich zu den Wasserstoffbrückenbindungen der Phosphatgruppe mit den NH_2 -Gruppen der Seitenkette auch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem freien Elektronenpaar der OH-Gruppe mit der ungeschützten Aminogruppe der Aminosäure erhalten. Die vorliegende Carboxylatgruppe der Aminosäure hat zudem einen möglichen Einfluss auf die höhere

Bindungsaffinität, da eine elektrostatische Abstoßung der Carboxylatgruppe mit der OH-Gruppe zustande kommen kann.^[130] Da die Methoxyphosphatpinzette **29** aber nun eine geringe Bindungsaffinität aufweist, kann davon ausgegangen werden, dass eben diese Wasserstoffbrückenbindung nicht ausgebildet werden kann oder ein anderer Bindungsmechanismus vorliegt.

Um nun einen Einschluss der Aminosäurenderivate zu überprüfen, wurden ^1H -NMR Spektren mit den 1:1 Komplexen von **29** mit Ac-Lys-OMe und Ac-Arg-OMe aufgenommen.

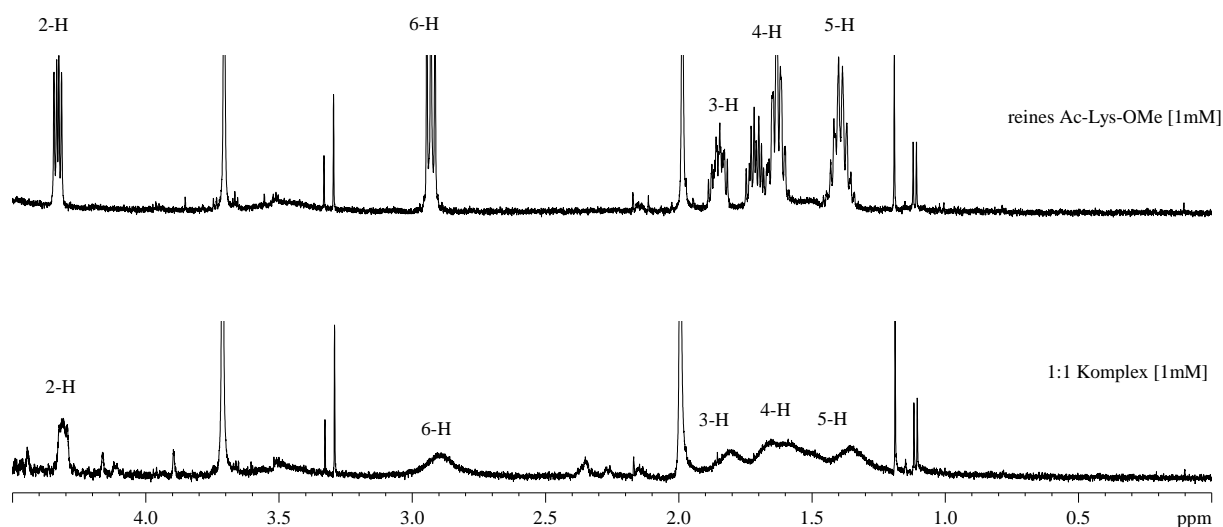


Abbildung 3.3.2.3: 1:1 Komplex von **29** mit Ac-Lys-OMe.

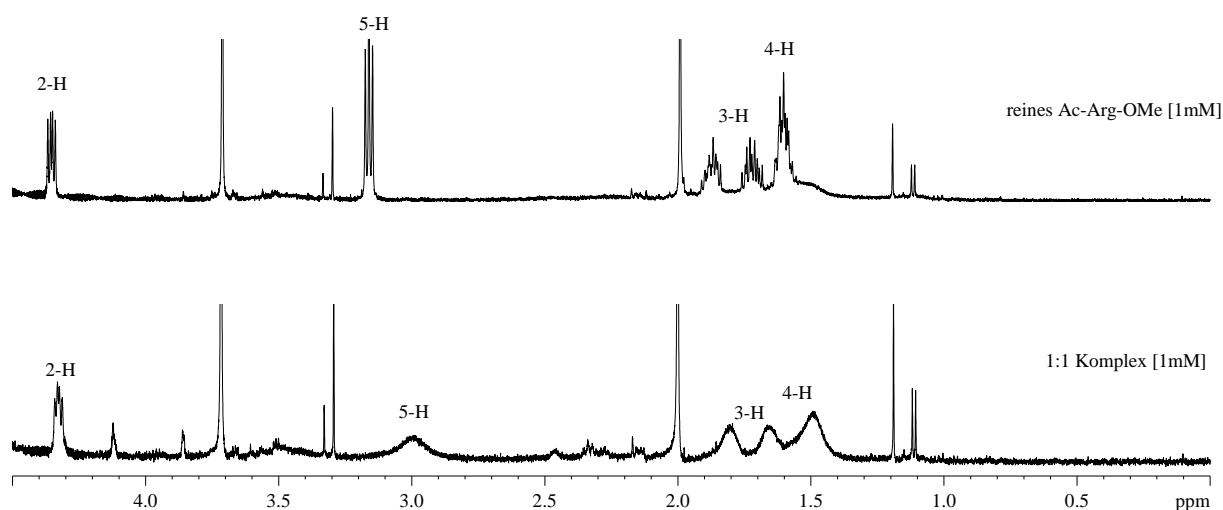


Abbildung 3.3.2.4: 1:1 Komplex von **29** mit Ac-Arg-OMe.

Die NMR-Spektren der Komplexe zeigen breite Signale der Protonen der Aminosäureseitenkette, jedoch bei nur einer schwachen Verschiebung. Die Verbreiterung der Signale lassen auf eine Wechselwirkung mit der Pinzette schließen. Da jedoch die Signale

nicht verschoben werden, kann diese Wechselwirkung lediglich an der Außenseite der Pinzette erfolgen, bzw. kann die Aminosäure sich nicht vollständig in der Kavität befinden. Letzteres kann darauf zurückzuführen sein, dass **29** nicht so gut im Puffer löslich ist, beziehungsweise, dass der Komplex der Aminosäuren mit **29** die Löslichkeit herabsenkt. Es wurde aus diesem Grunde von dem Komplex **29**:Ac-Arg-OMe ein weiteres Spektrum aufgenommen, dass einen Überschuss an **29** enthält (kalkuliert als 3:1 Komplex) und somit die Aminosäuren komplett von der Pinzette gebunden werden sollte.

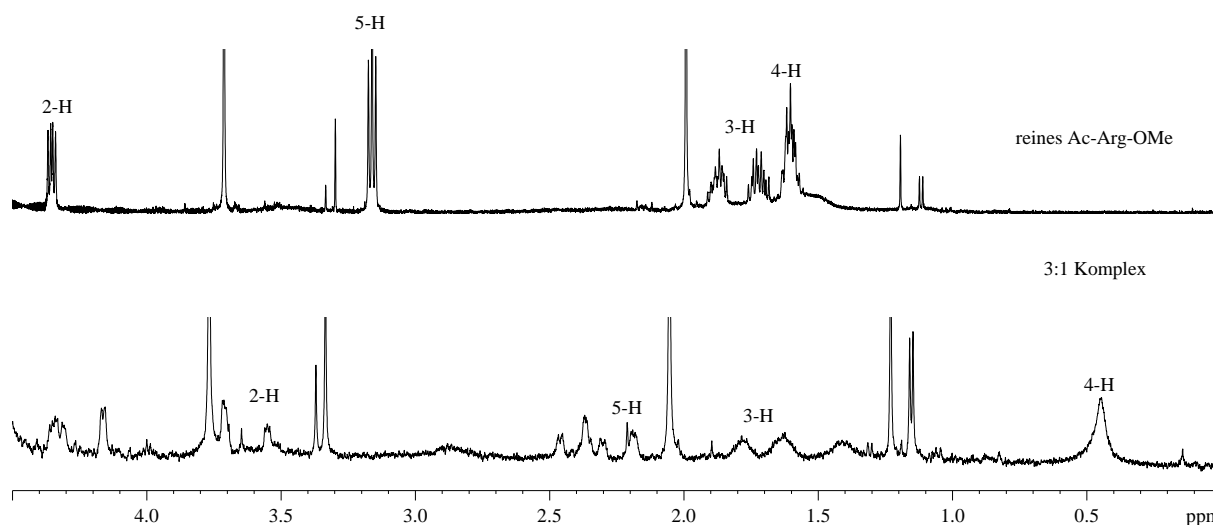
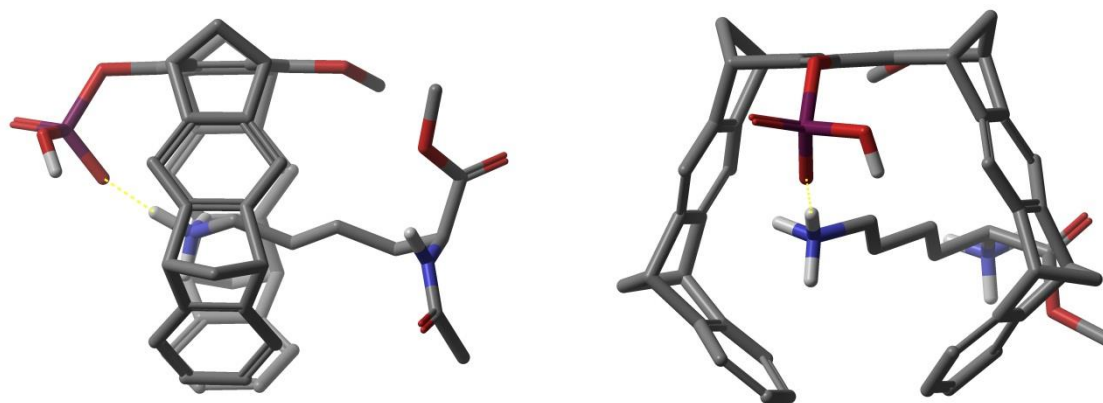


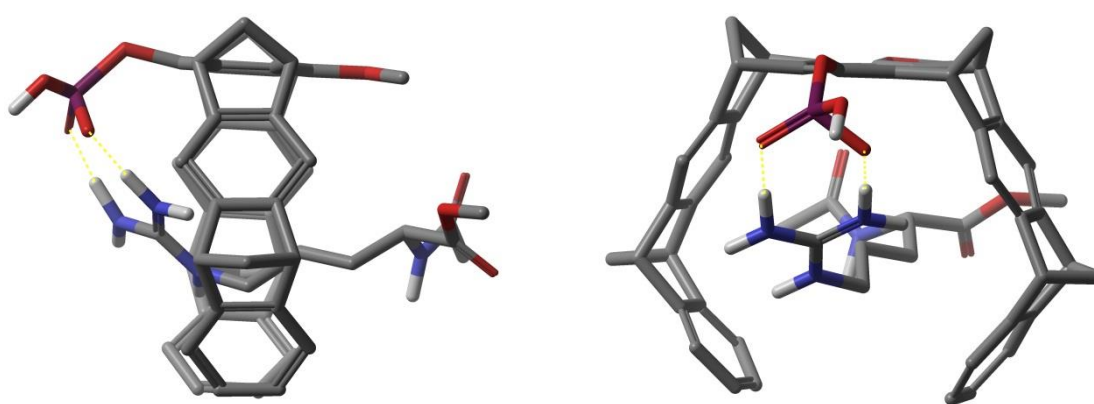
Abbildung 3.3.2.5: Komplex mit Überschuss an **29**.

Bei einem Überschuss an **29** sieht man deutlich eine Verschiebung der Protonen der Aminosäureseitenkette. Es kann somit von einem Einschluss der Aminosäure in der Kavität der Pinzette ausgegangen werden.

Um nun einen genauen Bindungsmechanismus zu erhalten, wurden Molecular Modeling Strukturen von **29** mit den geschützten Arginin- und Lysinderivat Ac-Arg-OMe/Ac-Lys-OMe, sowie mit dem nur am C-Terminus geschützten Lysin- und Argininderivat H-Lys-OMe/H-Arg-OMe kalkuliert.



29@Ac-Lys-OMe

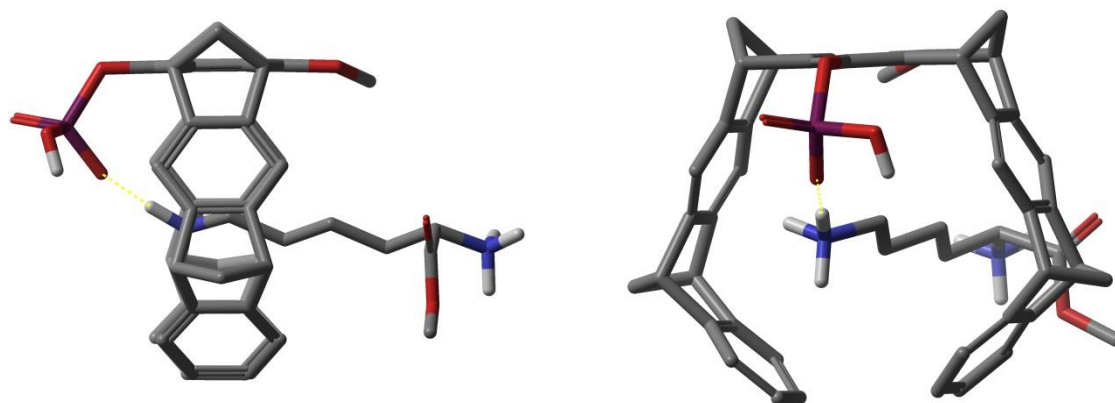


29@Ac-Arg-OMe

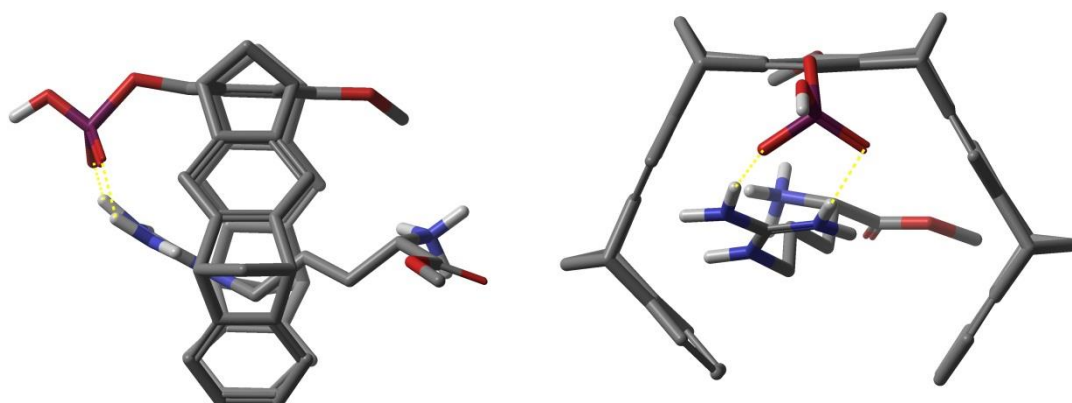
Abbildung 3.3.2.6: Molecular Modeling Strukturen von **29**. Oben: Komplex mit Ac-Lys-OMe, Unten: Komplex mit Ac-Arg-OMe (Macro Modal 9.2, OPLS_2005, Wasser, 5000 Schritte).

Anhand der Modeling Strukturen ist deutlich zu erkennen, dass von der Phosphatgruppe Wasserstoffbrückenbindungen ausgeübt werden (Abbildung 3.3.2.6). Die Bindungsaffinität der vollständig geschützten Aminosäurederivate wird durch die elektrostatische Wechselwirkung erhöht. Betrachtet man das einseitig geschützte Argininderivat H-Arg-OMe (Abbildung 3.3.2.7), so lässt sich nun der Unterschied in der Dissoziationskonstanten von **41** und **29** darin finden, dass **29** im Vergleich zu **41** keine Wasserstoffbrückenbindung von dem freien Elektronenpaar der OH-Gruppe, bzw. des Methylethers zu dem ungeschützten Amin ausbilden kann. Der Wasserstoffbrückenbindung muss somit eine bedeutende Wirkung auf die Bindungsaffinität zugerechnet werden. Sie beeinträchtigt im großen Maße die vorliegende Dissoziationskonstante. Zudem wird die Guanidiniumgruppe durch die Bindung mit dem Phosphat ein Stück aus der Kavität gezogen (Abbildung 3.3.2.6 und Abbildung 3.3.2.7). Dies kann der Grund dafür sein, dass die Bindung beider Lysinderivate stärker ist als die

entsprechenden Argininderivate, da die Seitenkette dieser sich nicht vollständig in der Kavität befindet. Durch die falsche Orientierung der Methoxygruppe kann keine Wasserstoffbrückenbindung der freien Elektronenpaare des Sauerstoffes mit der Aminogruppe der Aminosäure ausgebildet werden. Ferner hindert die Methoxygruppe sterisch eine gute Komplexierung.



29@H-Lys-OMe



29@H-Arg-OMe

Abbildung 3.3.2.7: Molecular Modeling Strukturen von **29**. Oben: Komplex mit H-Lys-OMe, Unten: Komplex mit H-Arg-OMe (Macro Modal 9.2, OPLS_2005, Wasser, 5000 Schritte).

Zusammenfassend lässt sich nun feststellen, dass die Methoxyphosphatpinzette Arginin- und Lysinderivate mit einer unterschiedlichen Affinität bindet. Das vollständig geschützte Argininderivat wird von **29** mit der gleichen Affinität gebunden wie von der Monophosphatpinzette **41**. Eine *N*-terminale Entschützung der Aminosäure steigert jedoch nicht die Affinität, da keine Wasserstoffbrückenbindungen der Methoxygruppe ausgebildet werden kann. Der Grund liegt in der sterisch hinderlichen Orientierung dieser Gruppe. Das

vollständig, sowie einseitig geschützte Lysinderivat wird jedoch mit gleicher Affinität gebunden und lässt sich mit der Komplexierung des *N*-Terminal ungeschützten Lysinderivat in der Monophosphatpinzette vergleichen. Als weitere Untersuchung wurden moleküldynamische Simulation von **29** mit Ac-Lys-OMe und Ac-Arg-OMe durchgeführt.

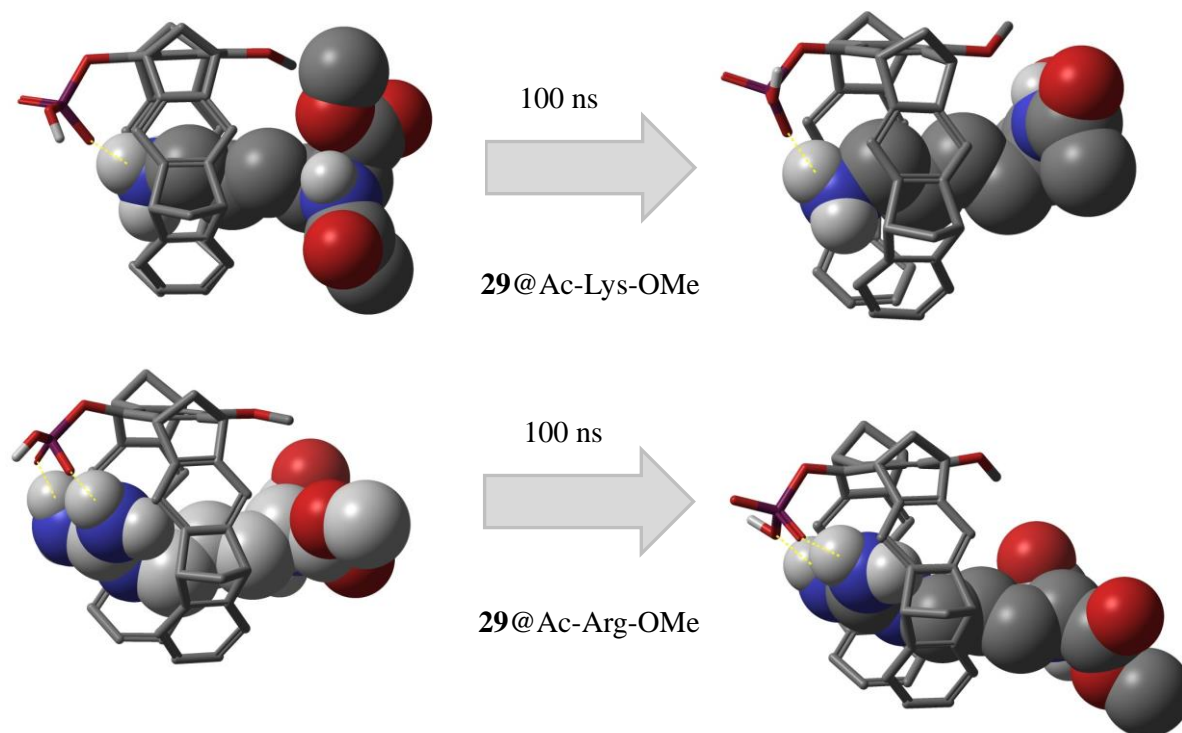


Abbildung 3.3.2.8: Moleküldynamische Simulationen von **29** mit Ac-Lys-OMe (oben) und Ac-Arg-OMe (unten) nach 100 ns (Macro Modal 9.2, OPLS_2005, Wasser). Startstrukturen besitzen die Konformation mit minimaler Energie nach Monte Carlo Simulationen.

Bei den moleküldynamischen Simulationen von **29** mit dem Lysinderivat nimmt die Methoxygruppe eine andere Konformation ein, so dass sich die Aminogruppe der Aminosäure den freien Elektronenpaaren des Ethersauerstoffs annähern. Es lässt darauf schließen, dass nach einer längeren Simulationsdauer eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Aminogruppe und des Ethersauerstoffs von **29** ausgeübt werden kann. Im Gegensatz dazu wird nach der moleküldynamischen Simulation von **29** mit dem Argininderivat deutlich, dass die Methoxygruppe eine sterische Hinderung ausübt. Die Seitenkette des Arginins ist weiterhin in der Kavität und bildet Wasserstoffbrückenbindungen mit der Phosphatgruppe aus, jedoch dreht sich das Aminosäuregrundgerüst von der Methoxygruppe ab. Die moleküldynamischen Simulationen der beiden Aminosäuren erklären den Unterschied der Bindungsaffinität von **29** zwischen Arginin und Lysin. So lässt sich die geringere

Assoziationskonstante von **29** mit Arginin damit erklären, dass einerseits die Guanidiniumgruppe des Arginin aus der Kavität von **29** gezogen wird, und andererseits durch die sterische Orientierung der Methoxygruppe die Aminosäure aus der Kavität geschoben wird. Bei den beiden Lysinderivaten ist neben der guten Komplexierung in der Kavität selber, die gleiche Bindungsaffinität damit zu bestätigen, dass die Methoxygruppe sich so orientiert, dass eine Möglichkeit besteht, eine Wasserstoffbrückenbindung auszubilden, ähnlich wie bei **41**.

Zusammenfassend verschließt die Methoxygruppe als kleinster Etherlinker sterisch leicht die Kavität, bzw. ist eine Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen des Ethersauerstoffes durch die sterisch hinderliche Orientierung der Gruppe zu den Aminosäuren nicht möglich. Der Unterschied der Bindungsaffinität zwischen den Lysin- und Argininderivaten wird in den MD-Simulationen deutlich. Die Methoxygruppe orientiert sich bei der Anwesenheit des Argininderivates sterisch ungünstig, in Folge dessen die Aminosäure aus der Kavität gedrängt wird. Bei den Lysinderivaten erfolgt eine sterisch günstige Orientierung der Methoxygruppe, die auf eine weitere Wasserstoffbrückenbindung vermuten lässt. Dies würde auch die gute Bindungsaffinität von **29** zu den Lysinderivaten erklären.

3.3.3 Untersuchungen der Carboxymethylphosphatpinzette **34**

Als dritte Pinzette wurde die Carboxymethylphosphatpinzette **34** untersucht, die die Phosphatpinzette **22** mit der Carboxymethylpinzette **24** vereinigt. Ferner soll sie Aufschluss über die Effektivität unterschiedlicher Anionen liefern.

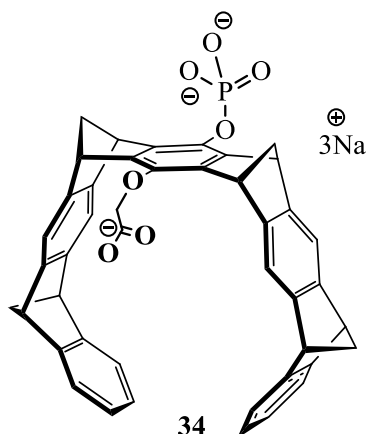


Abbildung 3.3.3.1: Carboxymethylphosphatpinzette **34**.

Zu Beginn wurde die Bindungsaffinität von **34** mittels Fluoreszenztitration untersucht und nach Gleichung (1) der K_a , bzw. K_d berechnet.

Tabelle 3.3.3.1: Durch Fluoreszenztitration bestimmte Dissoziationskonstanten von **34**.

Gast	Lösungsmittel	K_d [μ M]
Ac-Lys-OMe	10 mM Phosphatpuffer pH 7.2	$69 \pm 5\%$
Ac-Arg-OMe	10 mM Phosphatpuffer pH 7.2	$99 \pm 11\%$
H-Lys-OMe	10 mM Phosphatpuffer pH 7.2	$41 \pm 17\%$
H-Arg-OMe	10 mM Phosphatpuffer pH 7.2	$99 \pm 11\%$
H-Lys-OH	10 mM Phosphatpuffer pH 7.2	$297 \pm 19\%$
H-Arg-OH	10 mM Phosphatpuffer pH 7.2	$331 \pm 13\%$
KAA	10 mM Phosphatpuffer pH 7.2	$385 \pm 8\%$
KLVEF	10 mM Phosphatpuffer pH 7.2	$325 \pm 12\%$

Ac-Lys-OMe	10 mM Zitronensäure- Phosphatpuffer pH 4.0	193 ± 8%
H-Lys-OMe	10 mM Zitronensäure- Phosphatpuffer pH 4.0	87 ± 8%
H-Lys-OH	10 mM Zitronensäure- Phosphatpuffer pH 4.0	524 ± 13%

Wie der Tabelle 3.3.3.1 zu entnehmen ist, weist **34** eine erhöhte Bindungsaffinität zu den komplett geschützten und einfach geschützten Lysin- und Argininderivaten auf.

Bei einem Vergleich der Bindungskonstanten von **34** mit **24** und **22** kann die Bindungsaffinität von **34** mittig einsortiert werden (Tabelle 3.3.3.2). Es ist eine typische Hybridverbindung.

Tabelle 3.3.3.2: Übersicht Dissoziationskonstanten von **34**, **24** und **22**.

Gast	24 K_d [μ M]	34 K_d [μ M]	22 K_d [μ M] ^[54,56]
Ac-Lys-OMe	643 ± 7%	69 ± 5%	9 ± 6%
Ac-Arg-OMe	281 ± 18%	99 ± 11%	20 ± 5%
H-Lys-OH	1170 ± 20%	297 ± 19%	21 ± 4%
H-Arg-OH	609 ± 27%	331 ± 13%	-
KAA	33333 ± 83%	385 ± 8%	30 ± 3%
KLVFF	n.a.	325 ± 12%	20 ± 5%

Im Vergleich der Dissoziationskonstanten lässt sich festhalten, dass die Kombination aus beiden Anionen zu einer höheren Bindungsaffinität als der reinen Carboxymethylpinzette führt. Die reine Bisphosphatpinzette liefert jedoch die besten Bindungskonstanten. Die Substitution des einen Phosphats durch ein Carboxylat verringert die Bindungsaffinität.

Zu weiteren Untersuchung der Bindungen wurden auch Titrations mit ^1H -NMR-Spektren durchgeführt, um die maximale chemische Verschiebung von **34** mit der von **24** und **22** vergleichen zu können. Ferner lässt sich dadurch sagen, inwieweit die Gäste sich in der Kavität befinden und wie stark sie da gebunden werden.

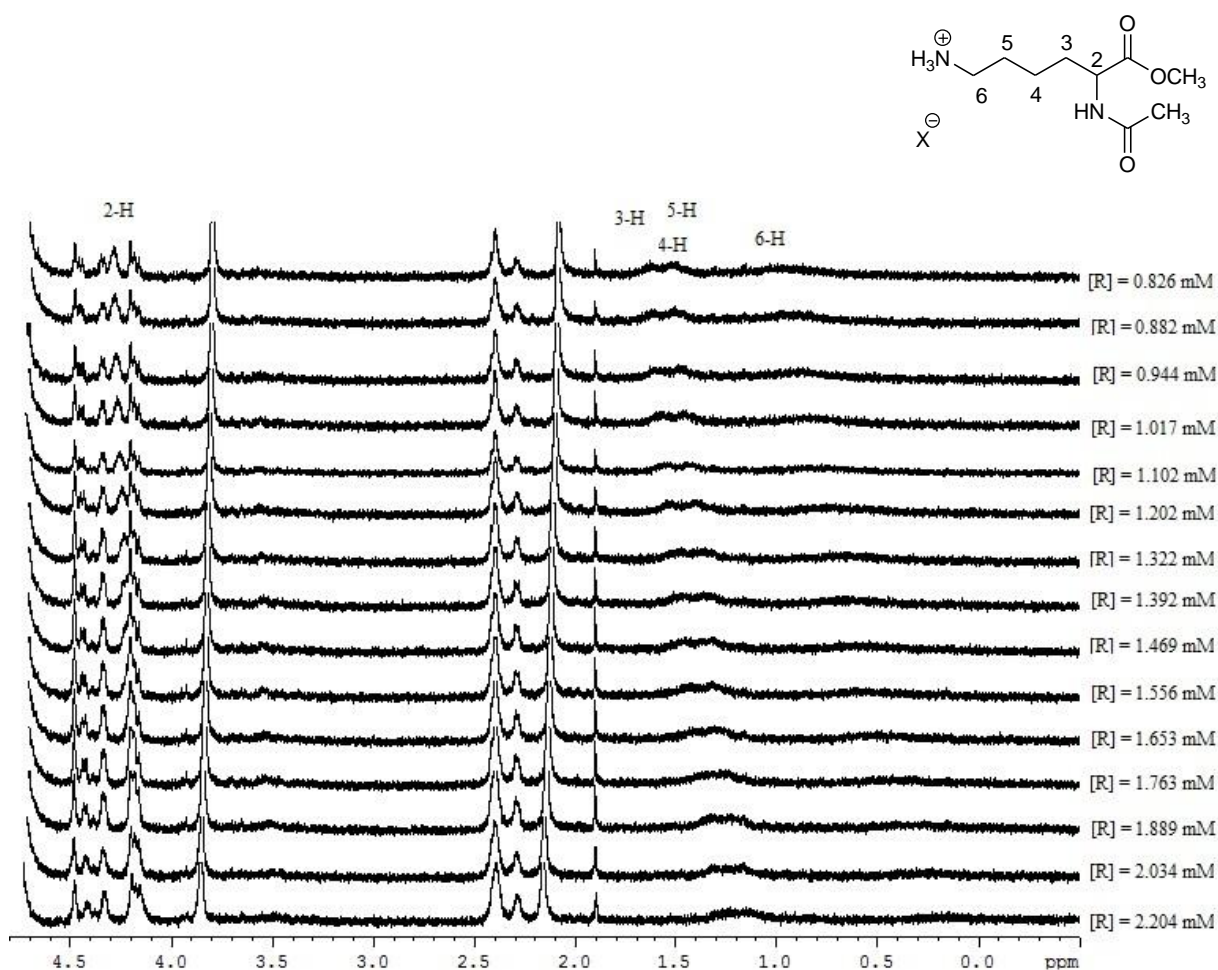


Abbildung 3.3.3.2: ^1H -NMR-Titration von **34** mit Ac-Lys-OMe in D_2O /Puffer.

Die Seitenkettenprotonen (3-6) des Lysinderivats zeigen eine starke chemische Verschiebung, das eine Komplexierung dieser in der Kavität bestätigt. Ferner ist zu erkennen, dass die Protonen alle breite Signale liefern, was auch ein Indiz für eine Komplexierung ist. Es lässt sich somit darauf schließen, dass die bereits durch Fluoreszenztitration ermittelte Assoziations-, bzw. Dissoziationskonstante ihre Richtigkeit hat.

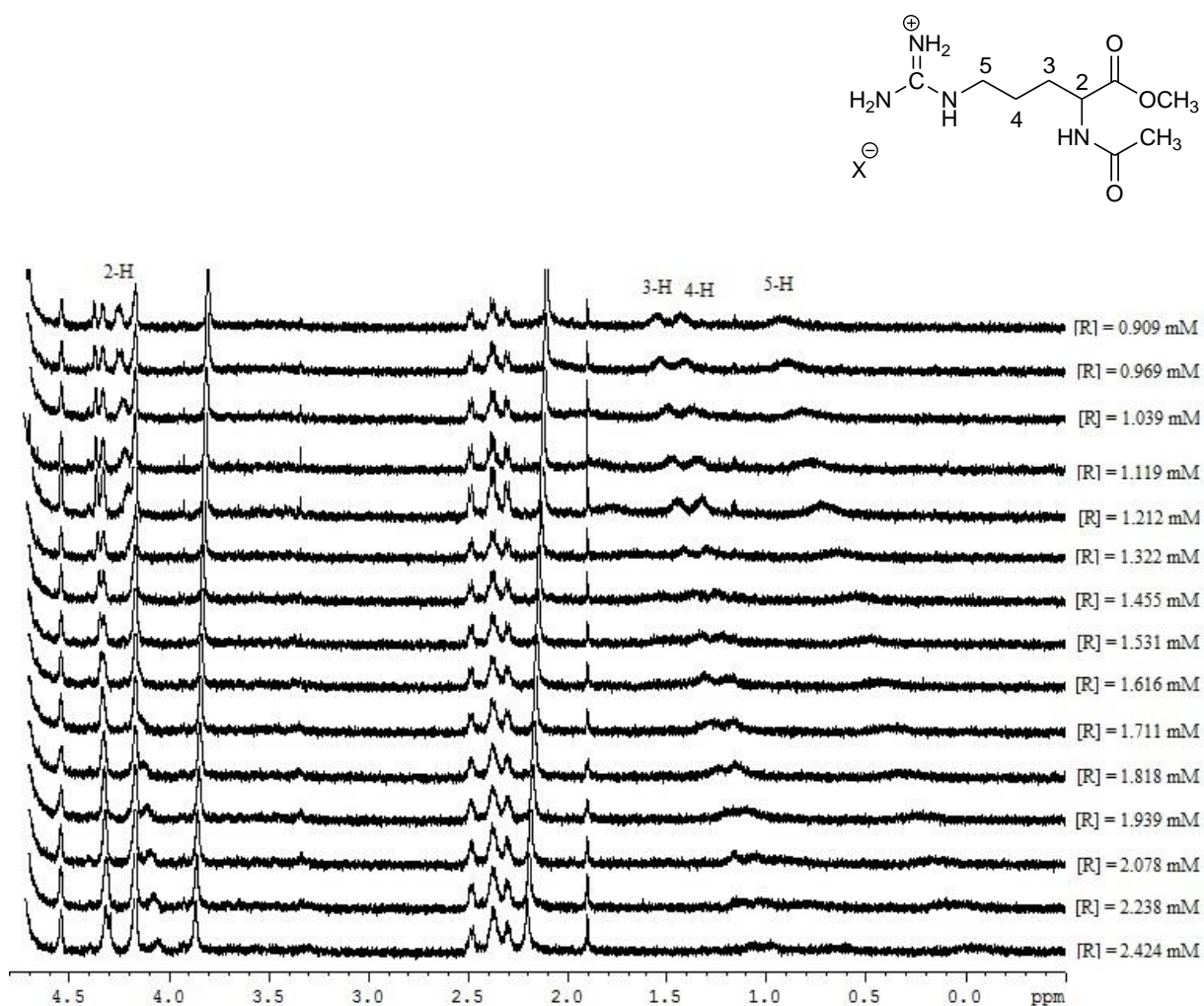


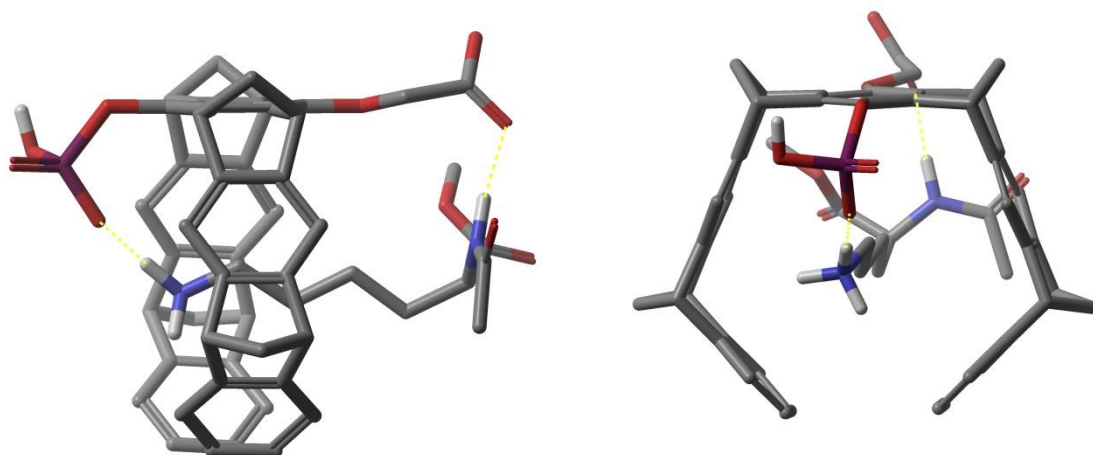
Abbildung 3.3.3.3: ¹H-NMR Titration von **34** mit Ac-Arg-OMe.

Die Spektren der ¹H-NMR-Titration von **34** mit dem Argininderivat zeigen auch eine starke Verschiebung der Seitenkettenprotonen (3-5). Wie bereits durch Fluoreszenztitrations festgestellt, wird auch diese Aminosäure von der Pinzette in der Kavität gebunden. Die ermittelten maximalen chemischen Verschiebungen sind in Tabelle 3.3.3.3 angegeben und aus diesen K_a , bzw. K_d nach Gleichung (2) berechnet.

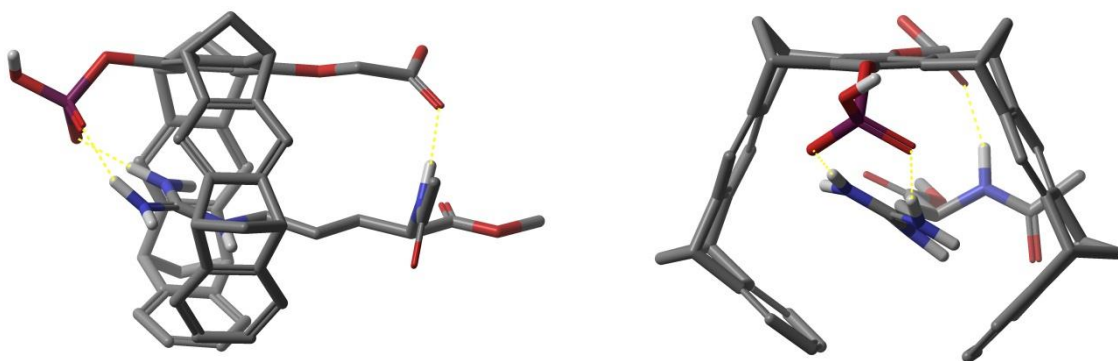
Tabelle 3.3.3.3: Dissoziationskonstanten und maximale chemische Verschiebung von **34** mit zwei verschiedenen Gastmolekülen.

Gast	$\Delta\delta_{\max}$ [ppm]	K_d [μ M]
Ac-Lys-OMe	6-H = 3.09, 3a-H = 1.647, 2-H = 1.378	$92 \pm 22\%$
Ac-Arg-OMe	5-H = 2.324, 2-H = 2.218	$99 \pm 25\%$

Die ermittelte maximale chemische Verschiebung deutet eine gute Bindungsaffinität an. Die ermittelten Dissoziationskonstanten liegen im Rahmen der bereits mit Fluoreszenztitration bestimmten Konstanten. Aber wie auch bei der Fluoreszenztitration werden Ausgleichskurven mit relativ großem Fehler erhalten. Dieser Fehler könnte daran liegen, dass es wichtig ist, wie das Lysin, bzw. Arginin sich der Kavität nähert. Um eine Übersicht zu erhalten, wie genau sich die Bindung ausbildet, also welche Anionen der Pinzette mit welchen Bestandteilen der Aminosäure Wasserstoffbrückenbindungen ausbildet, wurden moleküldynamische Simulationen durchgeführt. Für **34** ließen sich folgende Strukturen ermitteln.



34@Ac-Lys-OMe



34@Ac-Arg-OMe

Abbildung 3.3.3.4: Molecular Modeling Strukturen von **34** mit dem geschützten Lysin- und Argininderivat, Oben: **34** mit Ac-Lys-OMe, Unten: **34** mit Ac-Arg-OMe (Macro Modal 9.2, OPLS_2005, Wasser, 5000 Schritte).

Bei den simulierten Strukturen wird deutlich, dass **34** in der Lage ist, zwei bis drei Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. Die Bindung des Lysinderivats in der Kavität

wird durch zwei Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Diese Bindung ist trotzdem wesentlich schwächer als die Bindung des Lysinderivats in **22**. Dies muss folglich mit der Wasserstoffbrückenbindung des Carboxylatanions zusammenhängen. Um eine Affinität bei der Bindung der Aminosäure in der Kavität zu ermitteln, wurden mittels Molecular Modeling weitere Untersuchungen durchgeführt. Dabei fiel auf, dass, wenn die Pinzette ein Derivat entgegen gesetzt angeboten bekommt, so dass die Seitenkette sich zum Carboxylatanion ausrichtet, nach einer moleküldynamischen Simulation sich das Derivat gedreht hat und die Seitenkette immer zum Phosphation ausgerichtet vorliegt. Die Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Guanidiniumion, bzw. dem Ammoniumion und dem Phosphation scheint wesentlich stärker und attraktiver zu sein als die Bindung zum Carboxylat. Die Phosphatgruppe stellt somit die bevorzugte Bindungsseite dar.

Die Molecular Modeling Strukturen der beidseitig, sowie auch einseitig geschützten Lysin- und Argininderivate weisen die gleiche Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen auf. Ferner unterscheiden sich die Bindungskonstanten der beid- und einseitig geschützten Derivate kaum. Die ausgebildete Wasserstoffbrückenbindung kann somit kaum einen Einfluss auf die Bindungsaffinität haben, da sie theoretisch bei dem einseitig geschützten Derivat stärker sein sollte.

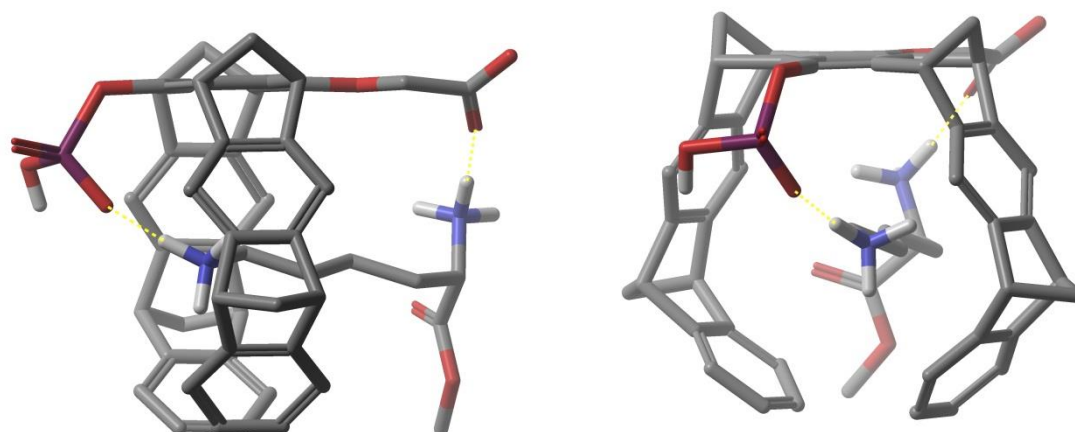
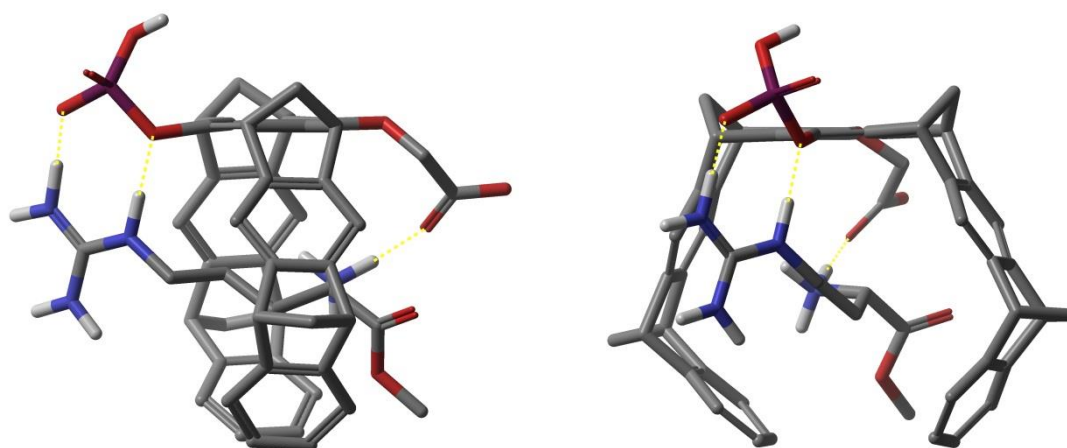
**34@H-Lys-OMe****34@H-Arg-OMe**

Abbildung 3.3.3.5: Molecular Modeling Strukturen von **34** mit dem einseitig geschützten Lysin- und Argininderivat, Oben: **34** mit H-Lys-OMe, Unten: **34** mit H-Arg-OMe (Macro Modal 9.2, OPLS_2005, Wasser, 5000 Schritte).

Mittels isothermer Mikrokalorimetrie wurden die Bindungskonstanten und die thermodynamischen Daten der Komplexe von **34** mit Ac-Lys-OMe und Ac-Arg-OMe untersucht. Die Dissoziationskonstanten liegen bei dieser Messmethode eine Größenordnung höher. Die freie Enthalpie der Komplexe sind recht hoch (Tabelle 3.3.3.4), die entsprechenden Werte für die Entropie des Komplexes liegen ebenfalls im hohen negativen Bereich, so dass das resultierende Produkt aus Entropie und Temperatur einen hohen positiven Wert liefert. Die aus diesen Werten resultierende Gibbs-Energie liegt jedoch im üblichen Rahmen. Der Prozess der Komplexbildung läuft exergonisch ab, jedoch nur unterhalb einer bestimmten

Grenztemperatur. Es muss der Betrag der freien Enthalpie immer größer sein als der Betrag von dem Produkt aus der Entropie mit der Temperatur.

Tabelle 3.3.3.4: Dissoziationskonstanten und thermodynamische Daten der Komplexe **34** mit Ac-Lys-OMe und Ac-Arg-OMe mittels ITC Messung.

	K_d [μM]	n	ΔH [kcal/mol]	$-T\Delta S$ [kcal/mol]	ΔG [kcal/mol]
34 @Ac-Lys-OMe	$279 \pm 7\%$	0.128	-18.67	13.805	-4.865
34 @Ac-Arg-OMe	$633 \pm 9\%$	0.301	-18.69	14.313	-4.377

Um genaueren Aufschluss über die Bindungsart zu erhalten, wurden moleküldynamische Simulationen durchgeführt.

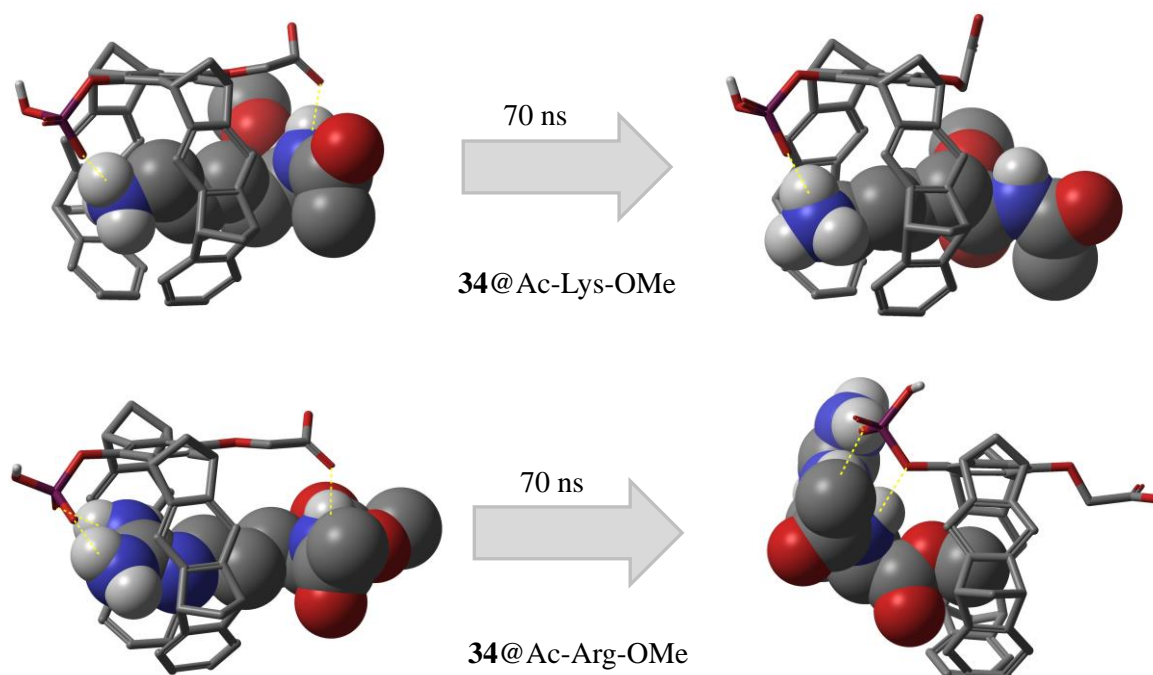


Abbildung 3.3.3.6: Moleküldynamische Simulationen von **34** mit Ac-Lys-OMe (oben) und Ac-Arg-OMe (unten) nach 70 ns (Macro Modal 9.2, OPLS_2005, Wasser). Startstrukturen besitzen die Konformation mit minimaler Energie nach Monte Carlo Simulationen.

Die Wasserstoffbrückenbindung der Aminogruppe zu dem Carboxylat wird durch eine sterisch hinderliche Orientierung der Gruppe aufgebrochen. Das Arginin wird in Folge dessen durch die Ausbildung von mehreren Wasserstoffbrückenbindungen zu der Phosphatgruppe aus

der Kavität der Pinzette **34** gezogen. Die Simulationen könnten erklären, warum **34** das Argininderivat schwächer bindet als das Lysinderivat. Die Wechselwirkungen mit der Kavität geht bei dem Argininderivat verloren.

Die Bindungsaffinitäten der Carboxymethylphosphatpinzette **34** im Vergleich zu den Bindungsaffinitäten der durch *Dutt* dargestellten und untersuchten Ethoxycarboxymethylphosphatpinzette **42** sind in folgender Tabelle 3.3.3.5 zusammengefasst.

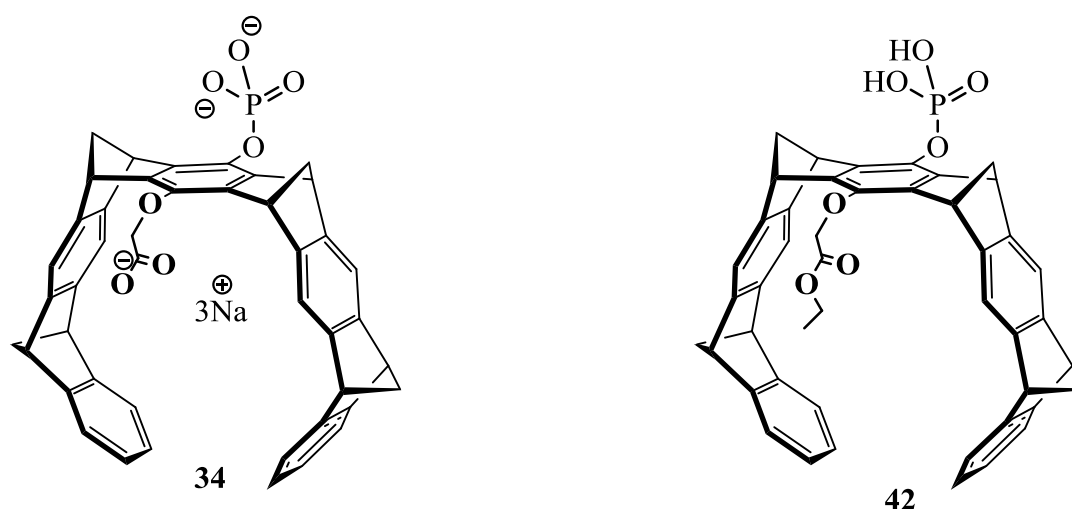


Abbildung 3.3.3.7: Strukturen des Na-Salzes der Carboxymethylpinzette **34** und des Ethoxyethers **42**.

Tabelle 3.3.3.5: Übersicht der durch Fluoreszenztitrations ermittelten Bindungskonstanten von **34** und **42** in 10 mM Phosphatpuffer pH 7.2, bzw. pH 7.6.

Gast	34 K_d [μ M]	42 K_d [μ M] ^[210]
Ac-Lys-OMe	$69 \pm 5\%$	$44 \pm 4\%$
Ac-Arg-OMe	$99 \pm 11\%$	$92 \pm 7\%$

Die Bindungsaffinitäten beider Pinzetten liegen im gleichen Rahmen. Trotz einer weiteren Ladung und somit der Möglichkeit, einer stärkeren Wasserstoffbrückenbindung des *N*-Terminus der Aminosäuren mit **34**, bindet diese genauso stark wie der Ester derselben. Diese Wasserstoffbrückenbindung scheint, somit keinen großen Einfluss auf die Bindungsaffinität auszuüben.

Eine weitere Untersuchung der Carboxymethylphosphatpinzette **34** wurde bei einem *pH*-Wert von 4 durchgeführt. Bei diesem *pH*-Wert sollte das Carboxylat protoniert vorliegen und sollte weiteren Aufschluss über die Bindungsaffinität liefern. So sollte bei vorliegender Säure, die Stärke der Wasserstoffbrückenbindung des Carboxylats zu der Aminosäure abnehmen.

Tabelle 3.3.3.6: Bindungsaffinitäten von **34** bei einem *pH* von 4.06.

Gast	34 K_d [μ M]
Ac-Lys-OMe	$193 \pm 8\%$
H-Lys-OMe	$87 \pm 8\%$
H-Lys-OH	$524 \pm 13\%$

Die Bindungsaffinität der Säure ist nur etwas schwächer als beim Salz. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass bei einem *pH* von 4.06 die Phosphatgruppe einfach protoniert vorliegt, welches bei einem *pH*-Wert von 7 nur teilweise der Fall ist. Diese „halbe“ negative Ladung, die nun an der Phosphatgruppe fehlt, könnte diesen Effekt der schwach abnehmenden Bindungsaffinität erklären. Dies hätte zur Folge, dass das Carboxylat keinen Einfluss auf die Bindungsaffinität hat, sondern lediglich die Carboxylgruppe die Affinität durch Wasserstoffbrückenbindungen erhöht. Die Molecular Modeling Strukturen zeigen einen Einschluss in der Kavität mit beidseitiger Wasserstoffbrückenbindung.

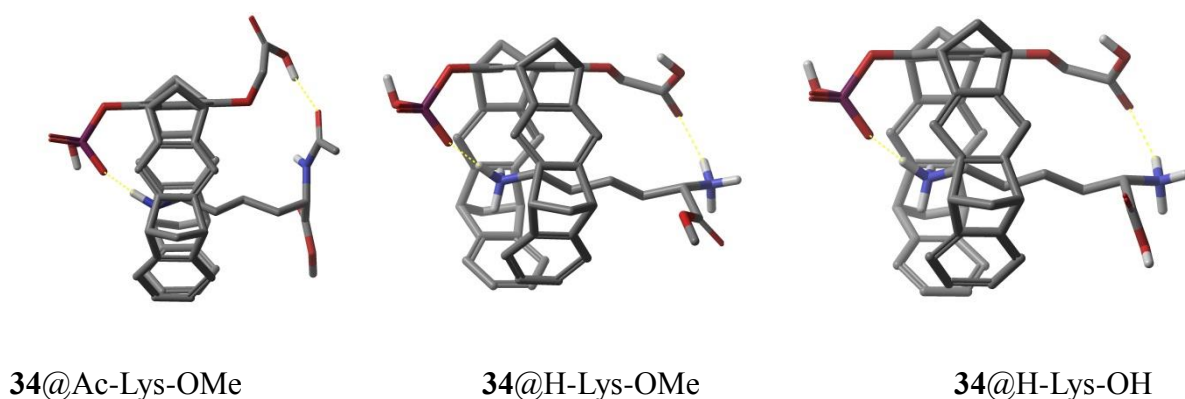


Abbildung 3.3.3.8: Molecular Modeling Strukturen von **34** mit einfach protoniertem Phosphat und protoniertem Carboxylat bei *pH* 4, Links: **34** mit Ac-Lys-OMe, Mitte: **34** mit H-Lys-OMe, Unten: **34** mit H-Lys-OH (Macro Modal 9.2, OPLS_2005, Wasser, 5000 Schritte).

Die Wasserstoffbrückenbindungen der Carboxymethylgruppe werden dabei einerseits von der Säure, aber auch von der Carbonylfunktion ausgeübt.

Zusammenfassend ermöglicht die Carboxymethylphosphatpinzette **34** einen näheren Einblick in den bereits durch **24** festgestellten Unterschied zwischen den Anionen Carboxylat und Phosphat. Einerseits wurde eine bevorzugte Bindungsseite ermittelt, bei der ausschließlich die Wasserstoffbrückenbindungen zu der Aminosäureseitenkette durch das Phosphation ausgebildet werden. Andererseits zeigten moleküldynamische Simulationen nach kürzester Zeit ein Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen vom Carboxylat zu den Aminosäuren. Die Bindung stellt sich als äußerst schwach heraus. Dieser Effekt wird auch beobachtet, wenn statt des Carboxylations die Säure vorliegt. Die Bindungsaffinitäten nehmen nur ganz schwach ab, das einzig auf das vorliegende einfach protonierte Phosphat zurückzuführen ist. Das Carboxylat ist folglich unattraktiv für die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen.

3.4 Untersuchungen an dem Enzym Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP-1)

3.4.1 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

In der Doktorarbeit von *Talbiersky* wurde bereits die Hemmung des PARP-1 Enzymes durch die Bisphosphatpinzette **22** gezeigt.

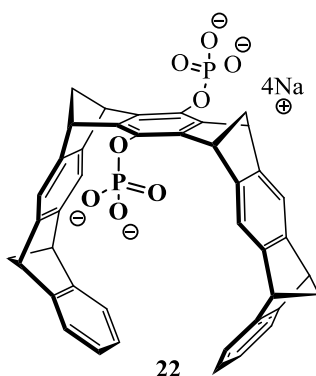
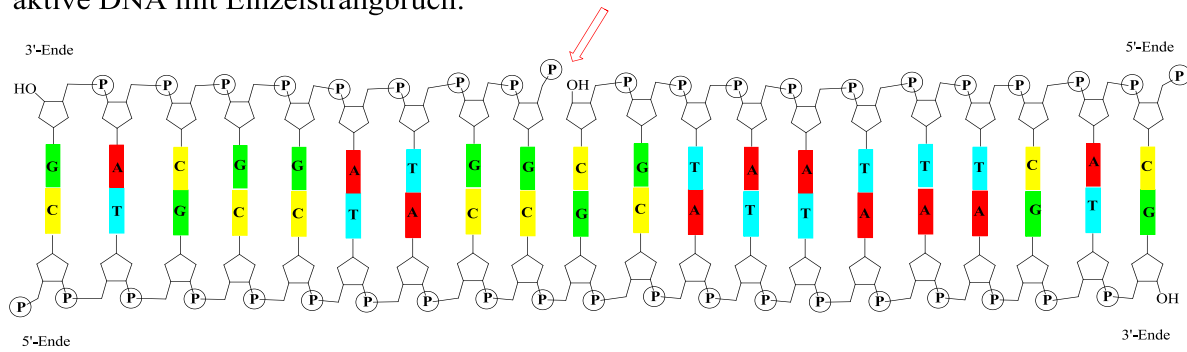


Abbildung 3.4.1.1: Aufbau der Bisphosphatpinzette **22**.

Es wurde ein IC_{50} -Wert von $3.3 \mu\text{M}$ ermittelt und die Kinetikmessungen zeigten einen nicht kompetitiven Hemm-Mechanismus. Durch MD Simulationen wurde eine Struktur gefunden, bei der eine Bindung von **22** an einem Lysin, das am Zinkfinger lokalisiert ist, ideal ist. Die Pinzette wäre so in der Lage, das Lysin in der Kavität zu binden und mit dem Phosphation eine Interaktion zum Zinkion des Zinkfingermotivs aufzubauen. Eine Fluoreszenztitration zeigte, dass **22** eine sehr hohe Affinität zum Zink aufweist ($K_d=5 \mu\text{M}$). Es wurde somit ein Mechanismus vermutet, bei dem die Pinzette durch die Bindung eines Lysins in der Zinkfinger-Domäne die DNA vom Zinkfinger verdrängt. Diese Vermutung sollte mittels eines Electrophoretic Mobility Shift Assay bewiesen werden. Wie bereits erwähnt, können mit dem EMSA Protein:DNA Wechselwirkungen kenntlich gemacht werden. Unter der Annahme, dass die Hemmung des PARPs durch die Pinzette die Wechselwirkungen mit der DNA beeinträchtigt, sollte diese Methode eine Änderung der Wechselwirkung zeigen.

Zunächst mussten die DNA-Einzelstränge (bezogen von *Metabion*) zu einem Doppelstrang generiert werden. Die jeweiligen verwendeten Doppelstränge der aktiven DNA mit Einzelstrangbruch und der intakten DNA hatten folgenden Aufbau.

aktive DNA mit Einzelstrangbruch:



intakte DNA:

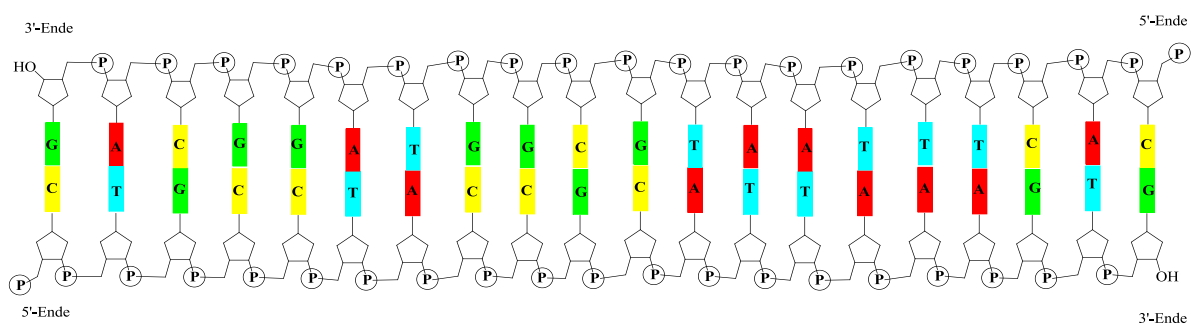


Abbildung 3.4.1.2: Aufbau der verwendeten DNA-Stränge. Abkürzungen: P: Phosphatgruppen, A: Adenin(rot), T: Thymin(blau), G: Guanin(grün), C: Cytosin(gelb). Der Strangbruch ist mit einem roten Pfeil markiert.

Für den EMSA wurde ein nicht denaturierendes Gel aus Polyacrylamid (7.5%) verwendet. Die Konzentrationen wurden so gewählt, dass sie den gleichen Größenordnungen wie in einem bereits bekannten EMSA mit PARP-1 Zinkfingerdomänen entsprechen.^[134] Das verwendete PARP-1 wurde von Trevigen bezogen und das eingesetzte Volumen musste je nach Proteinaktivität berechnet werden.

c(aktive DNA)	400 nM
c(PARP-1)	400 nM
c(intakte DNA)	400 nM
c(dialysiertes PARP-1)	400 nM
c(Bisphosphatpinzette)	100 μ M

Es wurden zunächst die Bindung der DNA an dem PARP-1 und die Auswirkungen der Pinzettengabe untersucht. So wurde ein Gel aufgebaut, das mit einer Spur reiner aktiver DNA, einer Spur aktiver DNA+PARP-1, einer Spur reines PARP-1 und einer Spur aktiver

DNA+PARP-1+Bisphosphatpinzette beladen war. Das Gel wurde mit dem Farbstoff SYBR[®] Green angefärbt, das die DNA nach dem gleichen Mechanismus wie Ethidiumbromid markiert. Der Vorteil gegenüber Ethidiumbromid liegt darin, dass die Färbung empfindlicher ist und auch kleinste DNA-Fragmente kenntlich gemacht werden können. Um zu wissen, wie weit das Enzym PARP-1 ins Gel gelaufen ist, wurde im Anschluss an die DNA-Färbung eine Proteinfärbung mit dem Farbstoff SYPRO[®] Ruby durchgeführt. Nach jeder Färbung wurden die Gele mit einem Spektrometer bei der Wellenlänge 255 nm mit einem SYBR[®] Green Filter, bzw. mit einem SYPRO[®] Ruby-Filter bei 285 nm untersucht. Die Untersuchungen im Gel1 sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

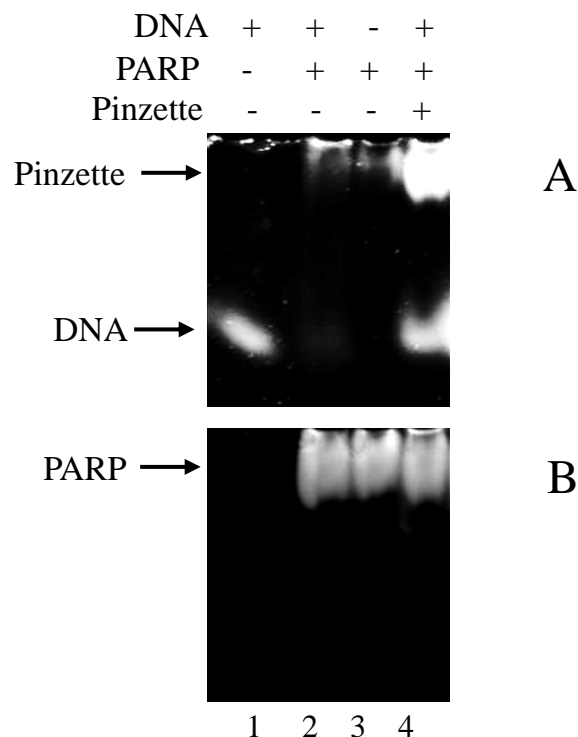


Abbildung 3.4.1.3: Gel 1 mit aktiver DNA, PARP-1 und Bisphosphatpinzette. Jeweilige Bestandteile der Kammern sind mit (+) und (-) gekennzeichnet. A: Gel 1 nach DNA-Färbung mit SYBR[®] Green ($\lambda = 255$ nm), die Pinzette wurde ebenfalls durch SYBR[®] Green angefärbt, B: Gel 1 nach Proteinfärbung mit SYPRO[®] Ruby ($\lambda = 285$ nm).

In der ersten Kammer ist nur reine aktive DNA vorhanden, die eine kleine Bande mit der SYBR[®] Green Färbung aufweist. Bei nachträglicher SYPRO[®] Ruby Färbung wird deutlich, dass kein Protein in dieser Kammer vorhanden ist. Die zweite Kammer wurde mit der aktiven DNA und dem PARP-1 beladen. Bei der DNA-Färbung mit SYBR[®] Green tritt keine Bande auf Höhe der freien aktiven DNA auf. Es muss somit die komplette DNA am Enzym gebunden vorliegen. Diese gebundene DNA wird wahrscheinlich durch die Bindung an dem

PARP-1 durch die Größe des Enzyms abgeschirmt und kann somit nicht durch die Färbung mit SYBR[®] Green kenntlich gemacht werden. Durch die Proteinfärbung mit SYPRO[®] Ruby wird die Bande des PARP-1 in Kammer 2 deutlich gemacht. Zur Überprüfung des Proteins wurde die Kammer 3 nur mit reinem PARP-1 beladen. Bei der DNA-Färbung mit SYBR[®] Green entsteht keine Bande, wie es auch zu erwarten war. Die Proteinfärbung mit SYPRO[®] Ruby zeigt deutlich die Enzymbande. Die letzte Kammer auf diesem Gel wurde mit aktiver DNA, PARP-1 und der Biphosphatpinzette beladen. Bei der Färbung mit SYBR[®] Green wird eine Bande auf Höhe der freien aktiven DNA erkennbar. Es ist somit bewiesen, dass die DNA durch die Zugabe von der Bisphosphatpinzette vom PARP-1 verdrängt wird und als freie DNA wieder im Gel kenntlich gemacht werden kann. Interessant ist auch, dass bei der DNA-Färbung eine zusätzliche Bande in Enzymhöhe angefärbt wurde. Dies ist auf die Bindung der Pinzette an dem Enzym zurückzuführen, da die Pinzette alleine im Gel nicht nachweisbar war. Bei der Proteinfärbung wird auch eine kleine Veränderung der Proteinbande bei der Zugabe der Pinzette kenntlich gemacht. Dieses erste Gel zeigt somit deutlich, dass die Pinzette durch die Bindung am PARP-1 die DNA vom Enzym verdrängt und auf diesem Wege die Enzymaktivität beeinflusst.

Zur näheren Überprüfung dieser Ergebnisse wurde ein weiteres Gel beladen und untersucht. Es sollte zeigen, dass nur eine aktive DNA (mit Einzelstrangbruch) am PARP-1 gebunden wird, dass die Pinzette nicht an der DNA bindet. Zudem sollte gezeigt werden, dass das Zink im Zinkfingermotiv Einfluss auf die DNA-Bindung, aber nicht die Pinzettenbindung hat. Es wurde dazu eine intakte DNA eingesetzt und aus dem vorhandenen Enzym vorher Zink mit einer EDTA-Lösung dialysiert. Das Gel wird im Folgenden dargestellt.

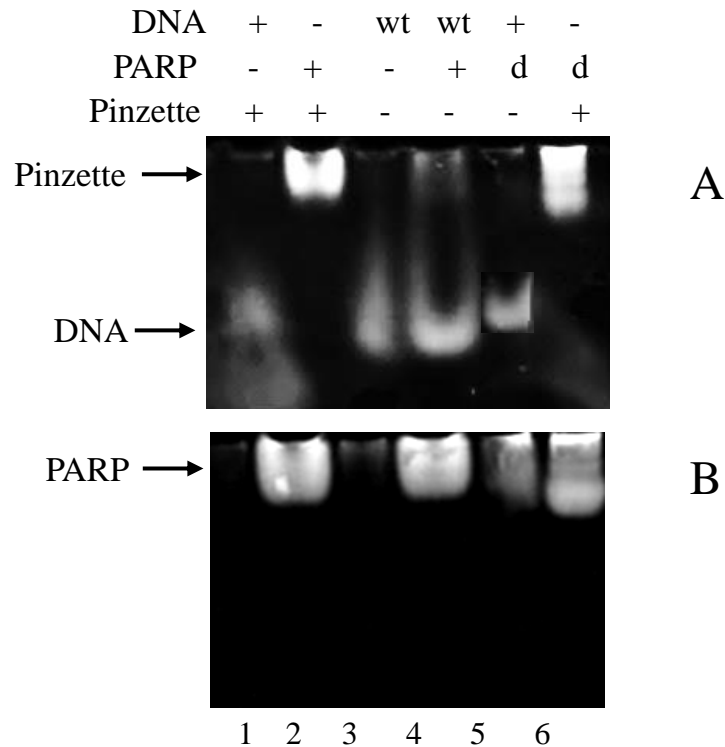


Abbildung 3.4.1.4: Gel 2 zur Überprüfung der Bindungen. wt: intakte DNA, d: dialysiertes PARP-1. Jeweilige Bestandteile der Kammern sind mit (+) und (-) gekennzeichnet. A: Gel 2 nach DNA-Färbung mit SYBR[®] Green ($\lambda = 255$ nm), die Pinzette wurde ebenfalls durch SYBR[®] Green angefärbt, B: Gel 2 nach Proteinfärbung mit SYPRO[®] Ruby ($\lambda = 285$ nm).

In der ersten Kammer erfolgte eine Beladung von aktiver DNA mit Bisphosphatpinzette. Bei der DNA-Färbung mit SYBR[®] Green wird eine schwache DNA-Bande auf Höhe der freien DNA erkennbar. Neben den bereits durch *Talbiersky* vorgenommenen Fluoreszenztitrationen der Pinzette mit der DNA, bei denen keine Bindung festzustellen war, zeigt nun der EMSA, dass keine Bindung zwischen der Bisphosphatpinzette und der DNA auftritt. Die Bisphosphatpinzette selber wird nicht im Gel detektiert, da sie aufgrund ihrer kleinen Molekülgröße schnell durch das Gel wandert und nicht durch die Gelmatrix aufgehalten wird. Die zweite Kammer wurde mit der Pinzette und dem reinen PARP-1 beladen. Bei der DNA-Färbung mit SYBR[®] Green wird wie bereits im Gel 1 eine Bande in Höhe des Enzyms sichtbar. Dies ist auf die Pinzette zurückzuführen. Die Eigenfluoreszenz der Pinzette kann ausgeschlossen werden, da das Gel versuchsweise einmal vor der Färbung untersucht wurde und keinerlei Fluoreszenz festgestellt werden konnte. Somit scheint die Bande durch die DNA-Färbung zustande zu kommen, in dem die Pinzette wohl mit angefärbt wird. Die Proteinfärbung zeigt wieder deutlich die Bande vom PARP-1. In den Kammern 3 und 4 des zweiten Gels wurde eine intakte DNA untersucht. In Kammer 3 ist diese alleine enthalten und

es ist bei der Färbung mit SYBR[®] Green eine kleine Bande zu erkennen. In der Kammer 4 wurde nun die Bindung einer intakten DNA mit PARP-1 untersucht. Die Bandenbildung zeigt deutlich, dass keine Bindung einer intakten DNA am Enzym stattfindet. Das Enzym arbeitet somit auch nur mit DNA mit Einzelstrangbruch. Die letzten beiden Untersuchungen beinhalten das Enzym ohne Zinkion (Spur 5+6). Es ist zu erwarten, dass PARP-1 ohne Zink nicht arbeiten kann, da die Struktur des Zinkfingers durch das Zink gewährleistet wird. Es läge folglich ein inaktives Enzym vor. Bei der Untersuchung des dialysierten Enzyms mit aktiver DNA ist eine leichte Bande zu erkennen, die etwas oberhalb der Bande der intakten DNA verläuft. Die DNA wird nicht vom Enzym gebunden, was aufgrund der Strukturänderung des Zinkfingermotives zu erwarten war. Die Proteinfärbung zeigt eine Bande, die sich deutlich von der des aktiven Enzyms unterscheidet. Die Zinkdialyse hat Struktur und Ladung (Wandergeschwindigkeit im Gel) des Enzyms beeinflusst. Die letzte Kammer zeigt nun noch mal deutlich, dass die Pinzette auch ohne Zink am PARP-1 bindet. Durch die DNA-Färbung wird wieder eine Bande auf der Enzymhöhe deutlich. Diese unterscheidet sich jedoch von der Bande, die durch die Bindung der Pinzette am intakten Enzym ausgebildet wird. Die Strukturänderung des Enzyms hat aber keinerlei Einfluss auf die Bindung der Pinzette. Somit kann die Aussage gemacht werden, dass die Pinzette zwar auch eine hohe Affinität zum Zink aufweist (Fluoreszenzmessung von *Talbiersky*), aber die Bindung zu den Lysinen des PARP-1 bevorzugt wird.

Mit dem EMSA ist es nun gelungen einen deutlichen Beweis zu liefern, dass die Bindung der Pinzette am Enzym die DNA vom Zinkfinger verdrängt. Weitere Untersuchungen lieferten zudem den Beweis, dass die Pinzette nur am PARP-1 und nicht an der DNA bindet. Ferner wurde bewiesen, dass lediglich aktive DNA von PARP-1 gebunden wird und dass das zinkfreie Enzym keinerlei Bindung zur DNA jedoch mit der Pinzette aufweist. So wird für eine Enzymaktivität das Zink benötigt. Vermutend kann gesagt werden, dass die Pinzette primär an den Lysinen des PARP-1 bindet und Interaktionen zum Zinkion aufweist und keine reine Zinkbindung stattfindet.

3.4.2 Kinetikmessungen

Um die Kinetik mit variabler Inhibitorkonzentration zu messen, wurde der nach *Putt* und *Hergenrother* entwickelte Assay genutzt. Die Messung erfolgt dabei diskontinuierlich. Bei diesem Assay wird nicht der biotinylierte Anteil an PAR ermittelt, sondern der Anteil an NAD^+ , der noch nicht durch PARP-1 poly-(ADP-ribosyl)iert wurde, wird in eine hochfluoreszenzfähige Verbindung mittels einer chemischen Reaktion überführt. Diese lässt sich mittels UV/Vis-Spektroskopie bei einem Adsorptionsmaximum bei 378 nm oder mittels Fluoreszenzspektroskopie mit einer Anregung von 360 nm und einer Emission bei 445 nm detektieren. Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 3.4.2.1 dargestellt.

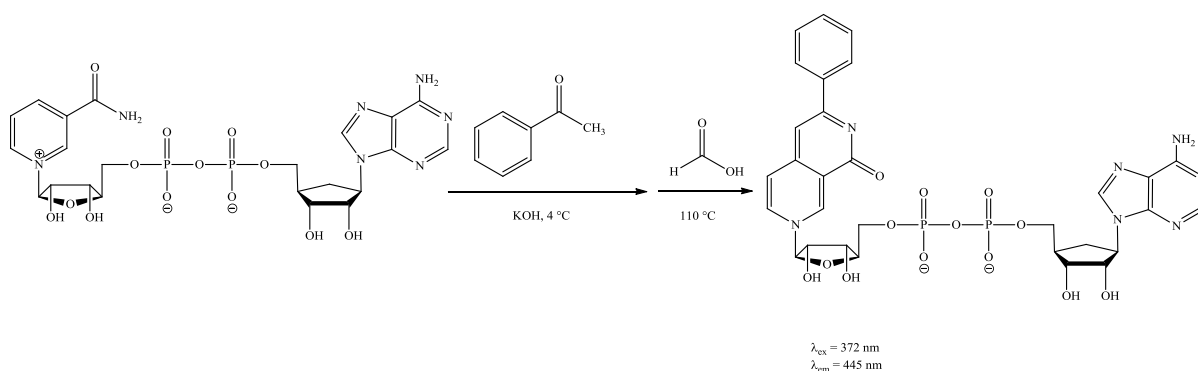


Abbildung 3.4.2.1: Reaktionsschema des *Putt* und *Hergenrother* Assays.

Zunächst erfolgt eine basenkatalysierte Kondensation von Acetophenon mit dem Nikotinamidring des NAD^+ zu einem Michael-Akzeptor. Nach der Michael-Addition wird das aromatische System durch eine Dehydrierung rückgewonnen. Diese Rearomatisierung ist die treibende Kraft dieser Reaktion. Die Durchführung des Assays beinhaltet die Voraussetzung, dass lediglich das unverbrauchte NAD^+ und nicht das durch die Poly-(ADP-Ribosyl)ierung abgespaltene Nikotinamid mit Acetophenon reagiert. Diese Voraussetzung wird allerdings durch die Literatur gewährleistet, da das Nikotinamid unter den im Assay herrschenden Reaktionsbedingungen inert ist und keinerlei Reaktion mit dem Acetophenon eingehen kann.^[135-138] Die Eigenfluoreszenz von Nikotinamid und NAD^+ bei 445 nm konnte ausgeschlossen und die Fluoreszenzintensität FI, bzw. die Emission E der Messungen wurden mit den Werten der NAD^+ -Konzentrationen in Verbindung gesetzt, um die Effektivität der Pinzette zu ermitteln.

Für den Assay wurden variable Konzentrationen an NAD^+ (50 nM, 75 nM, 100 nM, 250 nM, 500 nM pro Kavität) und variable Konzentrationen der Bisphosphatpinzette **22** (0 μM , 5 μM ,

10 μM , 20 μM , 50 μM) einsetzt. Die Konzentrationen an Enzym (2 $\mu\text{g/mL}$ pro Kavität) und an DNA (10 $\mu\text{g/mL}$) wurden konstant gehalten.

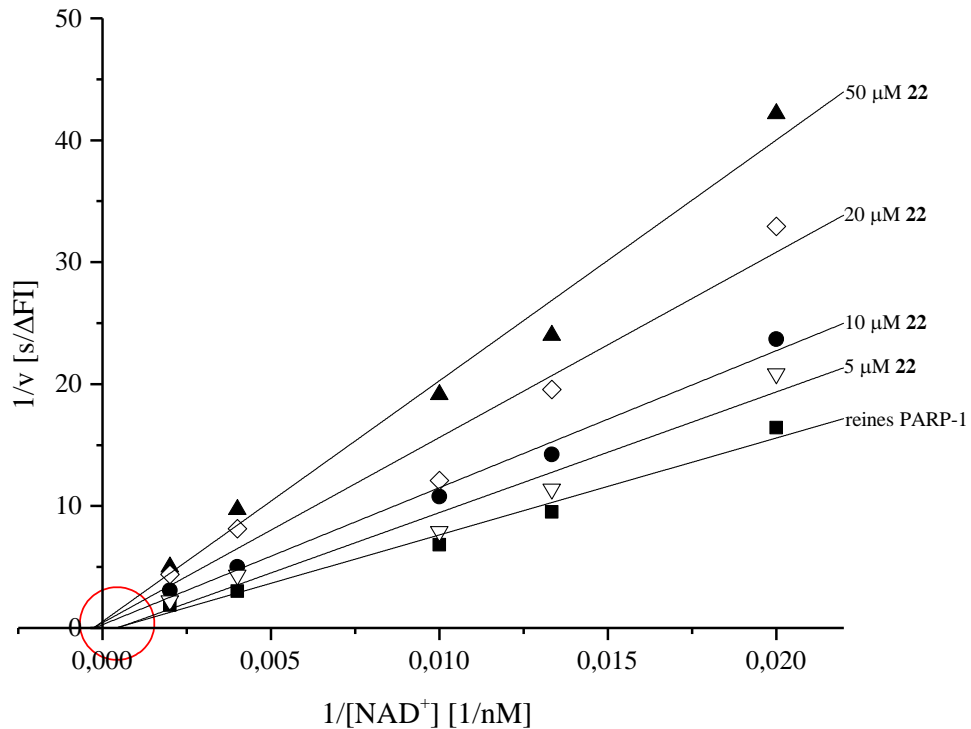


Abbildung 3.4.2.2: Lineweaver-Burk Plot des nativen PARP-1 und mit verschiedenen Konzentrationen an Phosphatpinzette 22.

Die Ausgleichsgeraden weisen bei unterschiedlichen Pinzettenkonzentrationen einen ähnlichen Verlauf auf. So liefert die Kinetikmessung für kleine Pinzettenkonzentrationen einen nichtkompetitiven Hemmmechanismus, wie er bereits durch *Talbiersky* gezeigt wurde. Wird die Pinzettenkonzentration auf über 20 μM erhöht, so verschiebt sich die Ausgleichsgerade etwas, es kann jedoch immer noch ein nicht kompetitiver Hemmmechanismus angenommen werden, da der Fehler der Ausgleichsgeraden nicht mit einbezogen wird. Es ist somit von einem gemeinsamen Schnittpunkt der nativen, sowie der Bindungsgeraden mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen auszugehen. Bei einer nicht kompetitiven Hemmung greift der Inhibitor sowohl am Enzym als auch Enzym-Substrat-Komplexes an. Das Reaktionsschema dieses Hemmtyps sieht wie folgt aus:

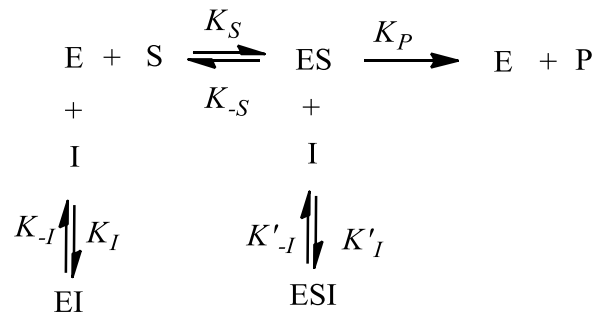


Abbildung 3.4.2.3: Reaktionsschema des nicht kompetitiven Hemmmechanismus.

Bei diesem Schema ist das Gleichgewicht zwischen dem Enzym-Inhibitor-Komplex und dem Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex weggelassen worden, da angenommen wird, dass sich alle Gleichgewichte sehr schnell einstellen (*rapid equilibrium*), was bei Bindungs- und Dissoziationsreaktionen der Fall ist.^[140]

Der nicht kompetitive Hemmmechanismus bedeutet nun, dass die Pinzette bei allen Konzentrationen sowohl am PARP-1 selber, aber auch an dem PARP-1-NAD⁺ Komplex bindet. Die Pinzette bindet somit nicht in der Substratbindungstasche und verhindert nicht die Entstehung des PARP-1-NAD⁺ Komplexes, sondern verhindert durch die Komplexierung basischer Aminosäuren des PARP-1 die Umsetzung des NAD⁺ und die Reparatur der aktiven DNA.

Um die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes (K_I) zu erhalten, muss die Dixon-Auftragung genutzt werden.^[141] Der Schnittpunkt der Gerade mit der X-Achse liefert die negative Dissoziationskonstante. Die Auftragung erfolgt $1/v$ gegen die Inhibitorkonzentration bei verschiedenen Substratkonzentrationen. Für die durchgeführten Kinetikmessungen ergibt sich im Mittel der Ausgleichsgeraden eine Dissoziationskonstante von 33 μM .

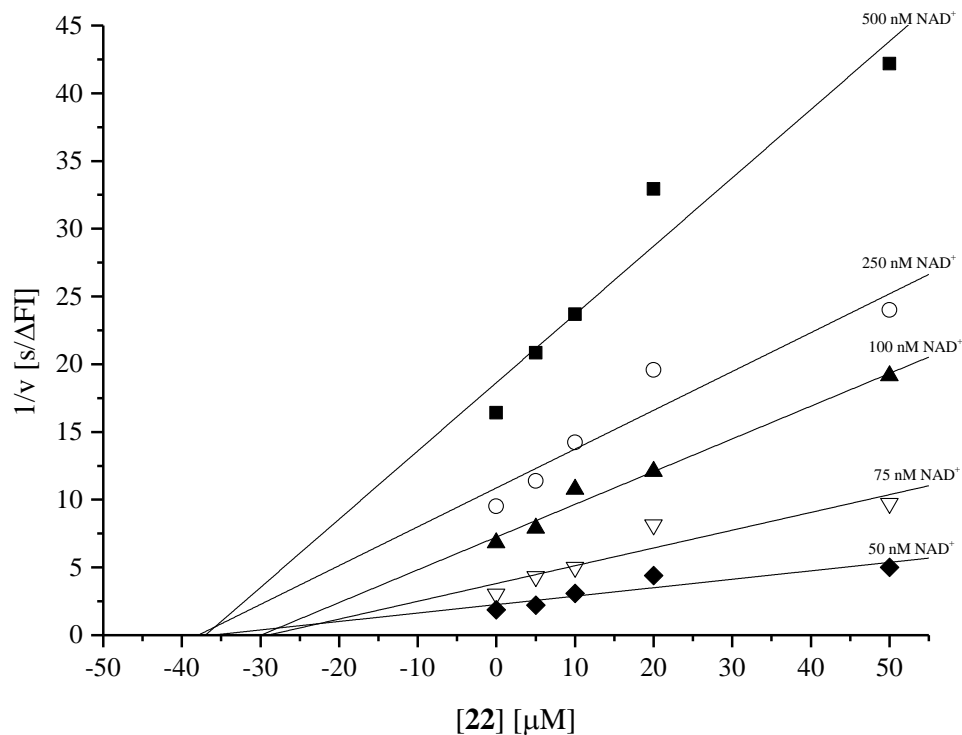


Abbildung 3.4.2.4: Dixon-Aufragung zur Ermittlung der Dissoziationskonstanten des Enzym-Inhibitor-Komplexes.

Da die Bindung der Pinzette unabhängig vom Substrat NAD^+ ist, sollte die Abhängigkeit der Bindung von der Konzentration der DNA untersucht werden. Es wurden somit Kinetikuntersuchungen durchgeführt, bei denen die NAD^+ -Konzentration 100 nM beträgt, jedoch die DNA-Konzentrationen 5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ und 20 $\mu\text{g/mL}$ pro Kavität beträgt. Die Untersuchungen erfolgten mit 10 μM und 50 μM Pinzette. Die Geraden in Abbildung 3.4.2.4 zeigen einen nicht linearen Verlauf. Verlängert man die Geraden, so wird ein Schnittpunkt derer im vierten Quadranten ermittelt. Dies zeigt einen nicht kompetitiven Hemmmechanismus der Pinzette in Bezug auf die DNA-Konzentration. Die Pinzette bindet sowohl am Enzym, als auch am Enzym-DNA Komplex. Dieses bestätigt die Ergebnisse des EMSAs, dass die Pinzette an dem PARP-1 bindet, ohne Anwesenheit von DNA und bei Anwesenheit von DNA diese vom Zinkfinger verdrängt.

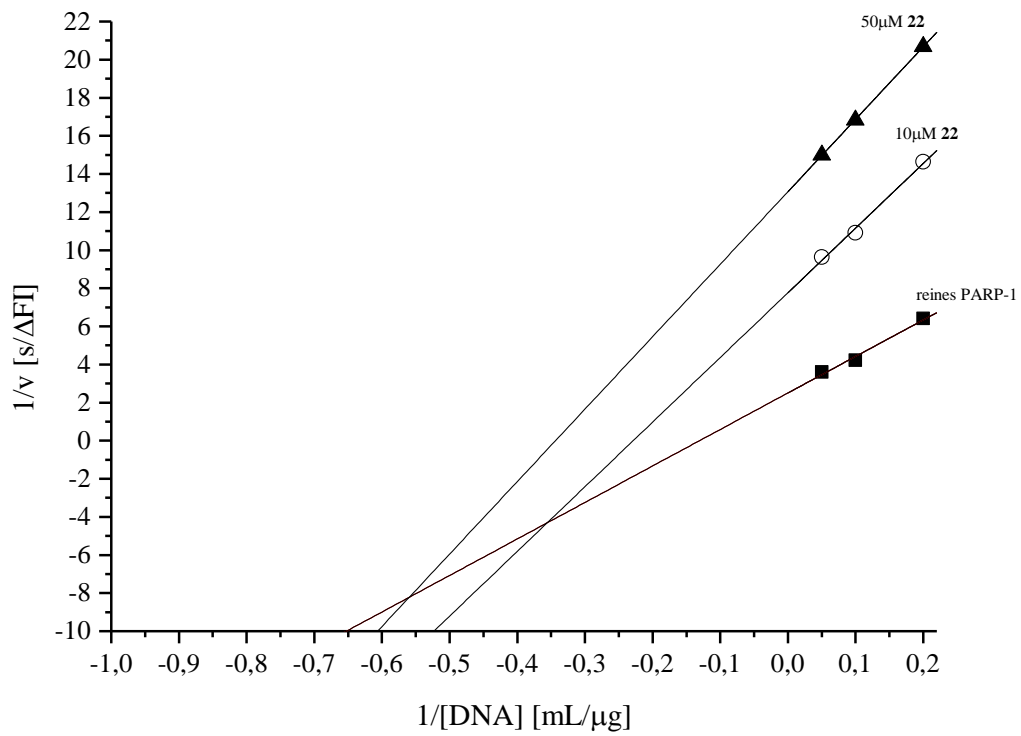


Abbildung 3.4.2.5: Lineweaver-Burk Plot in Abhängigkeit der DNA-Konzentration.

Schnittpunkt (10 μM 22/reines PARP-1): -0.36/-4.28.

Schnittpunkt (50 μM 22/reines PARP-1): -0.56/-8.38.

3.4.3 Untersuchung der Bindung mit Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Um einen Aufschluss über die freie Enthalpie des Komplexes (ΔH), sowie eine Stöchiometrie zu erhalten, wurden mikrokolorimetrische Untersuchungen durchgeführt. Da die kinetischen Untersuchungen eine hohe Hemmung des Enzyms durch die Pinzette ergeben haben, ist von einer hohen Assoziationskonstante auszugehen. In Folge dessen wurden die Untersuchungen mit Variationen an Konzentrationen durchgeführt. Leider zeigten alle Untersuchungen den gleichen Kurvenverlauf, der deckungsgleich mit dem Kurvenverlauf der Verdünnungstitration des Enzyms ist. Dies könnte verschiedene Ursachen haben. Zunächst könnte die Wärme, die durch die Komplexierung frei wird, geringer sein als die Verdünnungswärme, so dass erstere nicht detektiert werden kann. Eine weitere Besonderheit ist, dass das Enzym nach Zugabe der Phosphatpinzette viskos wird. Dies lässt auf eine Veränderung des Enzyms schließen, das ferner durch die Bindung der Phosphatpinzette an diesem zu erklären ist. Mittels Mikrokolorimetrie lassen sich somit leider keine Assoziationskonstante, Freie Enthalpie des Komplexes und die Stöchiometrie bestimmen.

3.5 Hemmung der Glucose-6-phosphat Dehydrogenase (G6PD)

Die Hemmwirkung der G6PD durch die molekulare Bisphosphatklammer **15E** beruht auf den Cofaktor-Fang der **15E** durch die Bindung des NADP^+ in der Kavität. Es wurde durch ausgiebige Kinetikversuche und durch moleküldynamische Simulationen ein ternärer Komplex festgestellt, in dem die Klammer **15E** sich in die Cofaktorbindungstasche einlagert und den Cofaktor NADP^+ in ihrer Kavität bindet. Nun ist bekannt, dass die Bisphosphatpinzette **22** in der Lage ist, die Enzymaktivität zu beeinflussen, wenn sie selektiv Lysine, bzw. Arginine bindet. Es erfolgte im Rahmen eines Kooperationsprojektes zwischen den Arbeitsgruppen *Schrader* von der Universität Duisburg-Essen und *Kirsch* vom Universitätsklinikum Essen eine Untersuchung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase mit der Bisphosphatpinzette **22**.

Die dazu erforderlichen kinetischen Studien wurden alle von *Kirsch* und seiner Mitarbeiterin *Wensing* durchgeführt.

3.5.1 Bestimmung der IC_{50} -Werte

Die quantitative Bestimmung der enzymatischen Aktivität erfolgte durch photometrische Verfolgung der Konzentrationsänderung des Cofaktors NADP^+ . Die reduzierte Form NADPH weist im Gegensatz zu der oxidierten Form NADP^+ ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 340 nm im UV/Vis-Bereich auf. Über die anfängliche lineare Extinktionszunahme des gebildeten NADPH lässt sich leicht der Umsatz bestimmen. Die Reaktionsdauer wurde dabei auf 300 s festgelegt, damit ein linearer Absorptionsanstieg gewährleistet wird. Es wurde bei den Messungen unter physiologischen Bedingungen gearbeitet. Das bedeutet, dass ein Kalium-Phosphatpuffer (50 mM) mit einem pH-Wert von 7.6 benutzt wurde und eine Temperatur von 37 °C während der Messung eingehalten wurde. Der Assay wurde mit verschiedenen Konzentrationen getestet, wobei die verwendete Endkonzentration im Assay 0.3 nM Enzym G6PD, 2.0 mM Substrat G6P und 0.3 mM Cofaktor NADP^+ betrug. Die verwendeten Pinzettenkonzentrationen wurden variiert. Für den klassischen G6PD-Assay muss ein großer Überschuss an Cofaktor und Substrat für eine optimale Durchführung eingesetzt werden.^[142] Der Assay wurde durch die Zugabe des Enzyms gestartet.

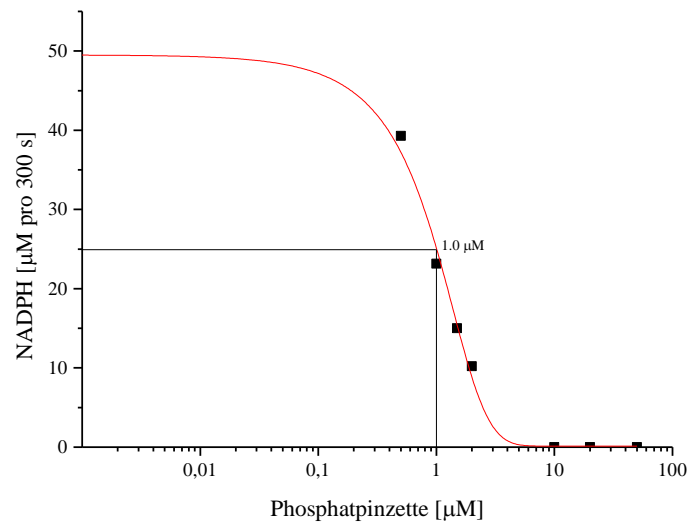


Abbildung 3.5.1.1: Logarithmische Auftragung der NADPH-Konzentration gegen die Inhibitorkonzentration zur Bestimmung der IC_{50} -Werte der Bisphosphatpinzette **22**.^[139]

Der für die Bisphosphatpinzette ermittelte IC_{50} -Wert liegt mit $1.0 \mu\text{M}$ deutlich unter allen bisher untersuchten Enzymhemmungen durch die Pinzette. Die außergewöhnlich hohe inhibitorische Effizienz muss einem bestimmten Mechanismus folgen. Aufschluss über den Mechanismus sollen die Kinetikmessungen liefern.

3.5.2 Bestimmung der Lineweaver-Burk Plots

Die Kinetik der Glucose-6-phosphat Dehydrogenase lässt sich mit dem Bireaktanden-Modell beschreiben. Es liegt dabei ein „Rapid-Equilibrium, Sequential Random Model“ vor, bei dem es keine Rolle spielt, ob erst Substrat A oder erst Substrat B an das Enzym (E) bindet.^[143]

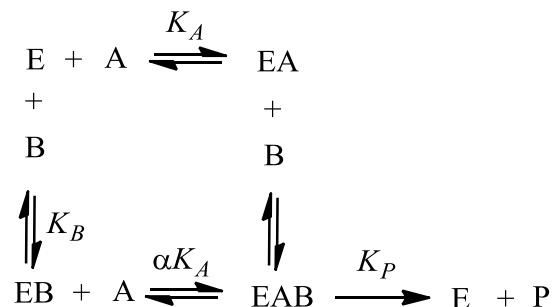


Abbildung 3.5.2.1: Schema des „Rapid-Equilibrium, Sequential Random Model“.

Da die Hemmwirkung der Pinzette durch die Komplexbildung von spezifischen Lysinen und Argininen resultiert, wurden Kinetik-Messungen mit variabler Cofaktor- und variabler Substratkonzentration durchgeführt. Bei den Kinetikmessungen mit variabler Cofaktor-Konzentration wurde die Konzentration des Enzyms auf 0.3 nM und die Konzentration des Substrats auf 2.0 mM eingestellt. Es wurden bei verschiedenen Cofaktor-Konzentrationen verschiedene Inhibitor-Konzentrationen untersucht.

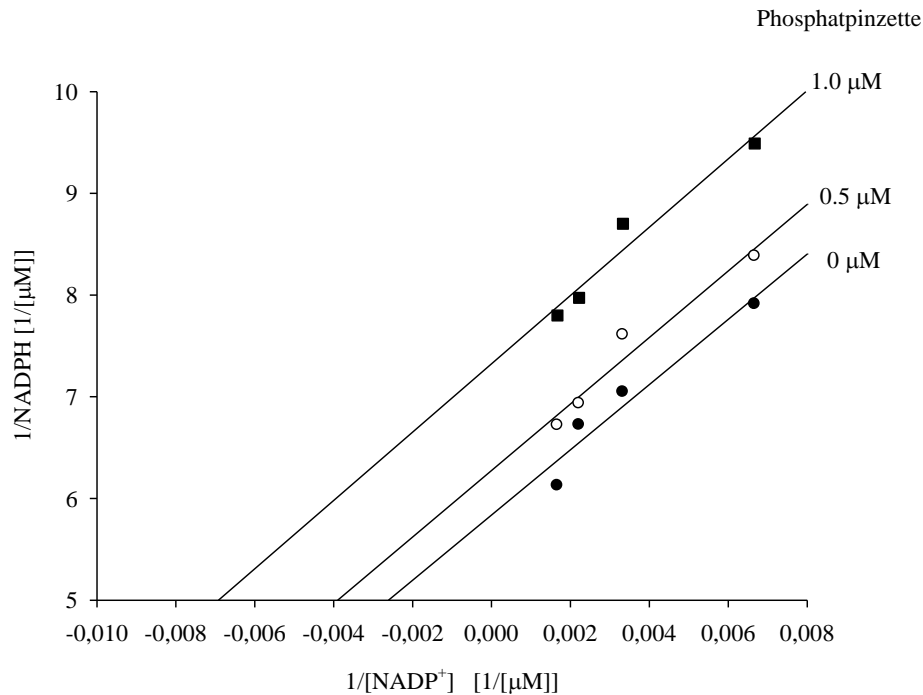


Abbildung 3.5.2.2: Lineweaver-Burk Plot der Bisphosphatpinzette **22** bei variabler Cofaktor-Konzentration.

Die Lineweaver-Burk Auftragung zeigt einen unkompetitiven Hemmmechanismus durch die parallel verlaufenden Geraden an. Bei einer unkompetitiven Hemmung reagiert der Inhibitor ausschließlich mit dem Enzym-Substrat-Komplex, bzw. Enzym-Cofaktor-Komplex.^[140] Das Reaktionsschema sieht wie folgt aus:

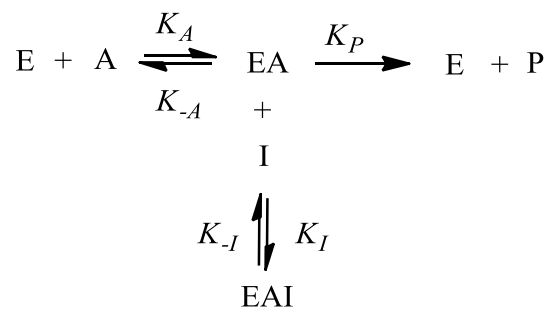


Abbildung 3.5.2.3: Reaktionsschema der unkompetitiven Hemmung.

Die Phosphatpinzette hemmt die G6PD unkompetitiv in Bezug auf die Variation der Cofaktorkonzentrationen. Die Pinzette bindet an dem Enzym-Cofaktor Komplex und verhindert einen Umsatz des Cofaktors. Es erfolgt eine Inhibierung durch den Überschuss an Cofaktor.

Bei den Kinetikmessungen mit variabler Substrat-Konzentration wurde die Konzentration des Enzyms auf 0.3 nM und die Konzentration des Cofaktors auf 0.3 mM eingestellt. Es wurden bei verschiedenen Substrat-Konzentrationen verschiedene Inhibitorkonzentrationen untersucht.

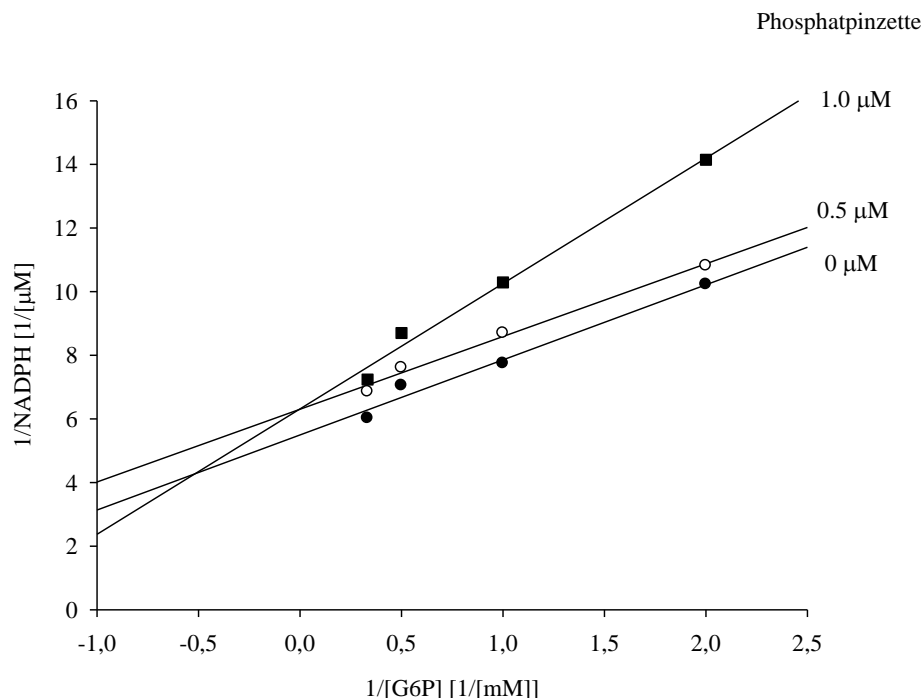


Abbildung 3.5.2.4: Lineweaver-Burk Plot der Bisphosphatpinzette **22** bei variabler Substratkonzentration.

Die Lineweaver-Burk Auftragung zeigt einen „mixed-inhibition“ Mechanismus. Wie bereits beschrieben reagiert der Inhibitor bei diesem Hemmtyp sowohl mit dem freien Enzym wie auch mit dem Enzym-Substratkomplex. Da die Lineweaver-Burk Plots auf eine Hemmung mit nichtkompetitive und unkompetitive Anteilen hinweist, muss $K_I > K_I'$ sein. Der Hemmmechanismus in Bezug auf variable Substratkonzentration ist somit abhängig von der Konzentration der Phosphatpinzette. Bei geringen Pinzettenkonzentrationen bindet diese an dem Enzym-Substrat Komplex und verhindert den Umsatz des Substrates. Die Hemmung findet somit durch den Überschuss an Substrat statt. Bei erhöhten Pinzettenkonzentrationen bindet diese in einem nicht kompetitiven Hemmmechanismus an dem Enzym, sowie an dem

Enzym-Substrat Komplex. Das Enzym bindet somit zwar das Substrat, kann dieses jedoch nicht umsetzen.

Da hohe Pinzettenkonzentrationen auf eine Hemmung der Substratbindungsstelle schließen lassen und die Kinetik der niedrigen Pinzettenkonzentrationen von einer Ausbildung eines ternären Komplexes mit dem Cofaktor spricht, sollen Inhibitions- und Reaktivierungsexperimente mit der Zugabe von Lysinderivat, Cofaktor und Substrat durchgeführt werden.

3.5.3 Inhibitions- und Reaktivierungsexperimente der G6PD

Dazu wurde der klassische G6PD-Assay in Kaliumphosphatpuffer (50.0 mM, pH 7.6, 37 °C) mit den Konzentrationen 0.3 nM G6PD, 2.0 mM G6P und 0.3 mM NADP⁺ untersucht. Es wurde zunächst eine Kontrolle des Assays durchgeführt. Danach folgte die Bestimmung der NADPH-Bildung nach Zugabe von 3 µM Phosphatpinzette. Durch die Zugabe von einem Lysinderivat sollte die Bildung von NADPH reaktiviert werden. Eine Zugabe von 1 mM Lysin ermöglichte jedoch nur eine Reaktivierung von ungefähr 80% der Kontrolle.

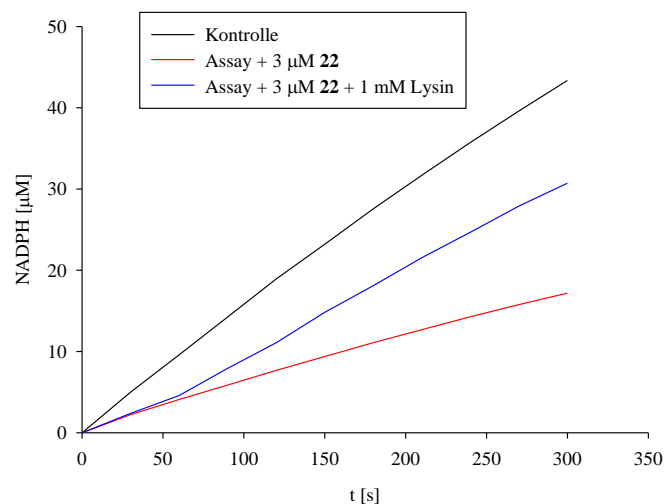


Abbildung 3.5.3.1: Reaktivierungsexperiment. Schwarz: Kontrolle, rot: Assay + 3 µM 22, blau: Assay + 3 µM 22 und 1 mM Lysinderivat.

Die Bindung der Phosphatpinzette an G6PD muss derart begünstigt sein, dass eine Reaktivierung einen so großen Überschuss an Lysin erfordert. Weitere

Reaktivierungsexperimente durch die Zugabe von Cofaktor, bzw. Substrat sollen Aufschluss über den genauen Bindungsort und den genauen Bindungsmechanismus liefern.

Die Reaktivierungsexperimente mit der Lysinzugabe lassen darauf schließen, dass entweder die Bindung der Pinzette an dem Enzym wesentlich attraktiver ist als die Bindung zu einem freien Lysin oder aber dass durch die Bindung der Pinzette an dem Enzym dieses so stark verändert wird, dass eine vollständige Reaktivierung und vollständige Tätigkeit des Enzyms nicht wieder hergestellt werden kann. Eine CD-spektroskopische Untersuchung soll Aufschluss darüber geben, ob das Enzym lediglich durch die Bindung der Pinzette reversibel die Konformation ändert oder aber irreversibel verändert wird.

3.5.4 Untersuchung der Bindung zwischen der Bisphosphatpinzette und G6PD mittels CD-Spektroskopie

Zu Beginn wurden erst mal CD-Spektren des nativen Proteins und einer künstlich denaturierten G6PD aufgenommen. Diese CD-Spektren dienen später als Vergleich, um die Auswertung der G6PD-Spektren in Gegenwart der Bisphosphatpinzette zu vereinfachen. Der UV/Vis-Bereich, der zum Nachweis der G6PD und einer potentiellen Denaturierung dieser durch entsprechende Inhibitoren wichtig ist, konnte durch die Literatur^[144] eingeschränkt werden. So konnte auch der messbare Konzentrationsbereich eingegrenzt werden. Es wurde jedoch zunächst eine höher konzentrierte Stammlösung ($5 \cdot 10^{-6}$ M) vermessen, die aber zügig verdünnt wurde ($1.56 \cdot 10^{-7}$ M). Nur mit einer so geringen Konzentration ließen sich die CD-Spektren zuverlässig auswerten. Der Messbereich lag in einem Wellenlängenbereich von 210 bis 260 nm. Alle CD-Messungen wurden in einer UV/Vis-durchlässigen Quarz-Halbmikroküvette mit einer Schichtdicke von 10 mm bei Raumtemperatur in 20 mM Tris-Puffer ($pH = 7.52$) vermessen. Um einen Vergleich für die möglicherweise durch Inhibitoren verursachte Denaturierung, bzw. Konformationsänderung der G6PD zu erhalten, wurden zunächst CD-Spektren künstlich induzierter G6PD-Denaturierungen aufgenommen. Es wurden zwei unterschiedliche Varianten untersucht: die Hitze-Denaturierung und die durch Detergenzien verursachte Denaturierung.^[145-147] Hitze-Denaturierung findet statt, wenn durch hohe Temperaturen eine strukturelle Veränderung des Proteins induziert wird. Die erforderliche Temperatur für die Denaturierung hängt stark vom jeweiligen Organismus ab. Thermophile Bakterien, die in heißen Quellen bei ca. 90 °C leben, besitzen äußerst

hitze stabile Proteine, die gerade bei Temperaturen um die 80 °C ihre größte enzymatische Aktivität zeigen. Für alle Denaturierungsvorgänge gilt, dass unter den herrschenden Bedingungen keine kovalenten Bindungen gespalten werden und die Primärstruktur, also die Abfolge der Bausteine, erhalten bleibt. Die Denaturierung kommt zustande, da die nicht-kovalenten Bindungskräfte, meist Wasserstoffbrückenbindungen, von den Nukleotiden und Aminosäuren der Proteine, durch die Energiezufuhr stark in Schwingung geraten und somit brechen. Das führt zu einer Veränderung der Sekundär- und Tertiärstrukturen, die den Verlust der enzymatischen Aktivität und die geringere Löslichkeit der Enzyme zu Folge hat. Letzteres wird meist durch „Ausflocken“ oder „Gerinnung“ sichtbar. Die Hitze-Denaturierung kann bis zu einem gewissen Grad reversibel verlaufen. Dafür muss aber gegeben sein, dass noch keine gravierenden strukturellen Veränderungen des Enzyms aufgetreten sind. Bei dem Versuch der Hitze-Denaturierung sind diese Bedingungen erfüllt. Dazu wurde die G6PD vor der Messung auf 50 °C erwärmt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Beide CD-Spektren, vor und nach der Erwärmung zeigen einen ähnlichen Verlauf. Es wurde jedoch ein CD-Spektrum bei 50 °C aufgenommen, dass eine höhere Intensität aufweist, das auf eine Konformationsänderung schließen lässt. Wie bereits erwähnt ist diese Konformationsänderung jedoch reversibel. Setzt man allerdings die G6PD einer Temperatur von 100 °C aus und lässt sie auf Raumtemperatur abkühlen, dann erfolgt eine irreversible Konformationsänderung des Enzyms. Die folgenden Abbildungen zeigen die oben beschriebenen Untersuchungen.

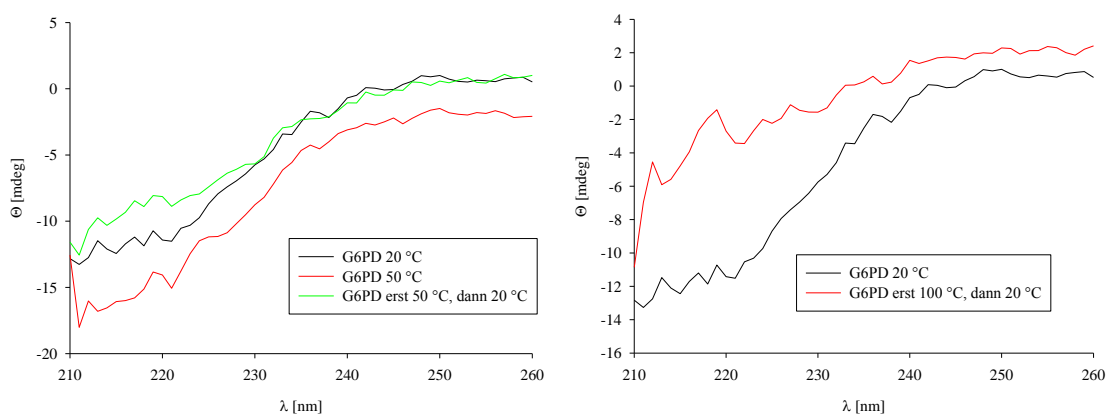


Abbildung 3.5.4.1: CD-Spektren künstlich induzierter Denaturierung von G6PD durch Hitzeeinwirkung. Die linke Abbildung zeigt eine reversible Konformationsänderung der G6PD bei einer Temperatur von 50 °C. Das rechte Spektrum zeigt bei 100 °C deutlich eine irreversible Denaturierung.

Als weitere künstlich induzierte Denaturierung wurde G6PD mit dem Detergens Guanidiniumchlorid versetzt. Durch die Zugabe des Guanidiniumchlorids werden die hydrophoben Wechselwirkungen, die den stabilen Kern globulärer Proteine zusammenhalten, vermindert und führt somit zu einer Veränderung der räumlichen Struktur des Enzyms. Es wurde zu der nativen G6PD-Lösung ein großer Überschuss an Guanidiniumchlorid-Lösung hinzugegeben und das CD-Spektrum gemessen. Dies weist eine deutlich strukturelle Änderung auf, welches eindeutig auf keinerlei Effekte von α -Helices zurückzuführen ist. Das Enzym hat sich folglich strukturell verändert.

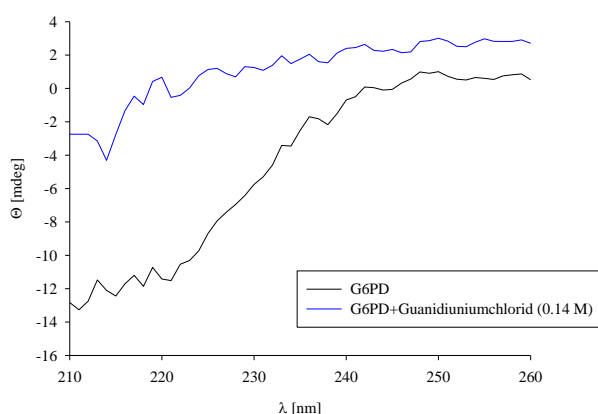


Abbildung 3.5.4.2: CD-Spektrum künstlich induzierter G6PD-Denaturierung durch die Zugabe des Detergens Guanidiniumchlorid.

Nachdem nun der Verlauf von CD-Spektren nativer und denaturierter G6PD geklärt war, konnte die Untersuchung der G6PD in Anwesenheit der Bisphosphatpinzette **22** durchgeführt werden. Es ist in dem CD-Spektrum deutlich zu erkennen, dass bei der Zugabe der Pinzette ein geringerer Anstieg der negativen Elliptizität des Komplexes im Gegensatz zum reinen Enzym vorliegt. Es deutet darauf hin, dass durch die Pinzettenzugabe eine Konformationsänderung des Enzyms vorliegt. Durch die Zugabe eines Überschusses des Lysinderivates Ac-Lys-OMe als Konkurrenz-Molekül konnte das CD-Spektrum der nativen G6PD annähernd zurückgewonnen werden. Dies bestätigt den bei Inhibitions- und Reaktivierungsexperimenten beobachteten reversiblen Prozess. Die Konformationsänderung, die das Enzym durch die Bindung der Pinzette an der Proteinoberfläche durchläuft, lässt sich durch die Zugabe von Ac-Lys-OMe wieder rückgängig machen.

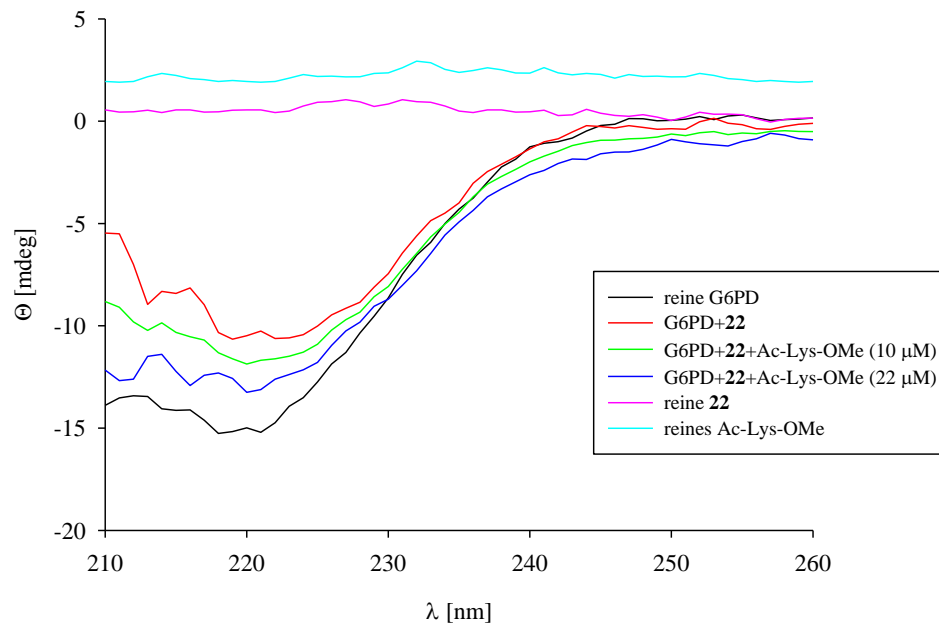


Abbildung 3.5.4.3: CD-Spektrum der G6PD mit der Bisphosphatpinzette **22**.

3.5.5 Untersuchung mittels Isothermer Titrationskalorimetrie (ITC)

Für die Bestimmung der freien Enthalpie des Komplexes wurden mikrokalorimetrische Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurde Glucose-6-phosphat Dehydrogenase (0.010 mmol) in der Zelle vorgelegt und portionsweise, in 10 μ L Schritten die Phosphatpinzette **22** (1.166 mmol) zugegeben. Es wurden dabei Kurven erhalten, die einen typischen sigmoidalen Verlauf aufweisen (Abbildung 3.5.5.1). Dieser Verlauf lässt auf eine große Bindungsaffinität schließen.

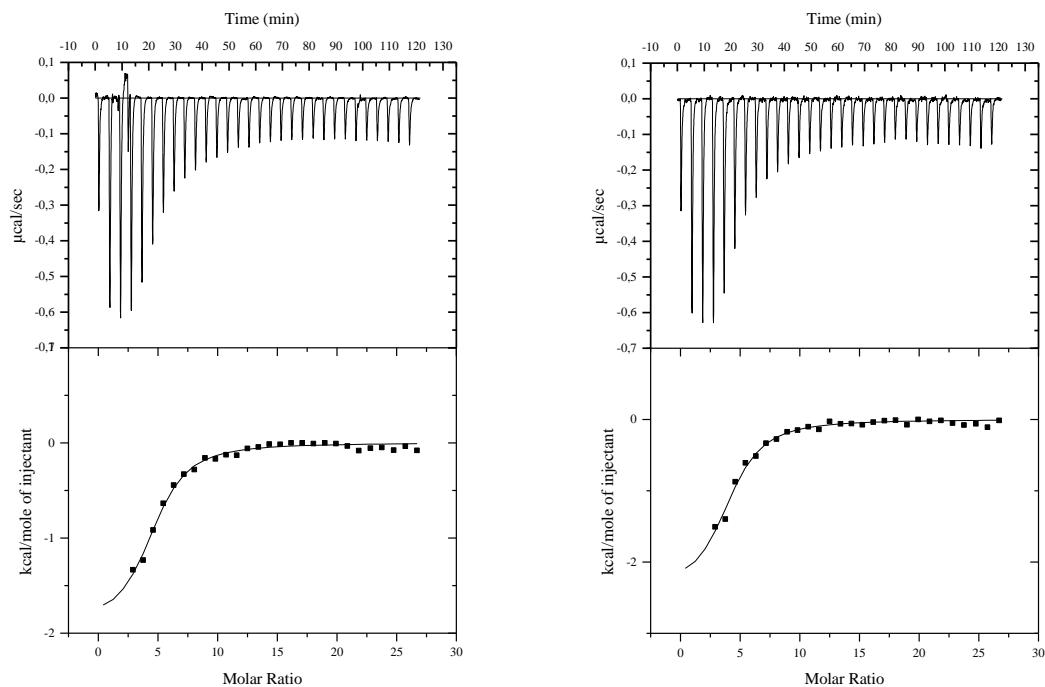


Abbildung 3.5.5.1: ITC-Spektren zur Bestimmung der Assoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes von G6PD (0.010 mmol) mit der Phosphatpinzette **22** (1.166 mmol).

Zur Auswertung dieser Spektren wird das *ITC-MicroCal* Programm für *Origin* genutzt.^[153] Die Auswertung der beiden Spektren mit der Gleichung (11) ergab folgende Bindungskonstanten und thermodynamischen Daten.

Tabelle 3.5.5.1: Aus den ITC-Kurven ermittelten Werte.

K_d [μM]	n	ΔH [kcal/mol]	$-T\Delta S$ [kcal/mol]	ΔG [kcal/mol]
$1.16 \pm 20\%$	0.217 ± 0.01	-8.833	0.739	-8.094
$1.46 \pm 23\%$	0.244 ± 0.017	-9.928	1.968	-7.960

Die ermittelten Werte beider mikrokaloimetrischer Titrationsen ergeben Bindungskonstanten und thermodynamische Daten in der gleichen Größenordnung. Die Komplexbildung verläuft nach den thermodynamischen Daten exergonisch, also thermodynamisch bevorzugt ab. Die Stöchiometrie beläuft sich auf 1:4 bis 1:5 (G6PD:**22**).

4. Zusammenfassung und Ausblick

4.1 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die Enzyme Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP-1) und Glucose-6-phosphat Dehydrogenase (G6PD) in Bezug auf die Hemmung durch die Bisphosphatpinzette **22** untersucht. Des Weiteren wurden neue molekulare Pinzetten entwickelt und auf die Komplexierung von Lysin- und Argininderivaten untersucht.

Die Untersuchung des Enzyms Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP-1) wurde bereits im Rahmen der Doktorarbeit von *Talbiersky* untersucht. Dabei wurde schon festgestellt, dass die Pinzette einen IC_{50} Wert von $3.3 \mu M$ aufweist. In diesem Zusammenhang hat *Talbiersky* enzymkinetische Untersuchungen mit einer festen Inhibitorkonzentration von $5.0 \mu M$ durchgeführt und einen nicht kompetitiven Hemmmechanismus erhalten. Durch die hohe Affinität der Phosphatpinzette zu Zinkionen, die auch durch Fluoreszenztitrationen bestätigt wurde, sowie auch durch die Möglichkeit das Enzym durch große Zugabe an DNA wieder zu reaktivieren, wurde die Vermutung aufgestellt, dass die Phosphatpinzette an dem Zinkfinger bindet. Durch MD-Simulationen wurden Strukturen ermittelt bei denen die Phosphatpinzette ein Lysin am Zinkfinger in der Kavität bindet und das Zink durch Interaktion der zweiten Phosphatgruppe komplexiert. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde durch den Einsatz eines Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) gezeigt, dass durch die Komplexierung der Phosphatpinzette die DNA vom Zinkfinger des PARP-1 verdrängt wird. So ist deutlich im nicht denaturierendem Gel eine Bande der freien DNA zu erkennen, wenn die Spur mit DNA, PARP-1 und Phosphatpinzette beladen wird. Ferner lässt sich durch das Anfärben der Phosphatpinzette durch das DNA-Färbemittel SYBR[®] Green deutlich erkennen, dass diese an dem PARP-1 bindet. Eine Bindung der Phosphatpinzette verändert zudem nicht das Laufverhalten des Enzyms, das mit SYPRO[®] Ruby angefärbt wurde.

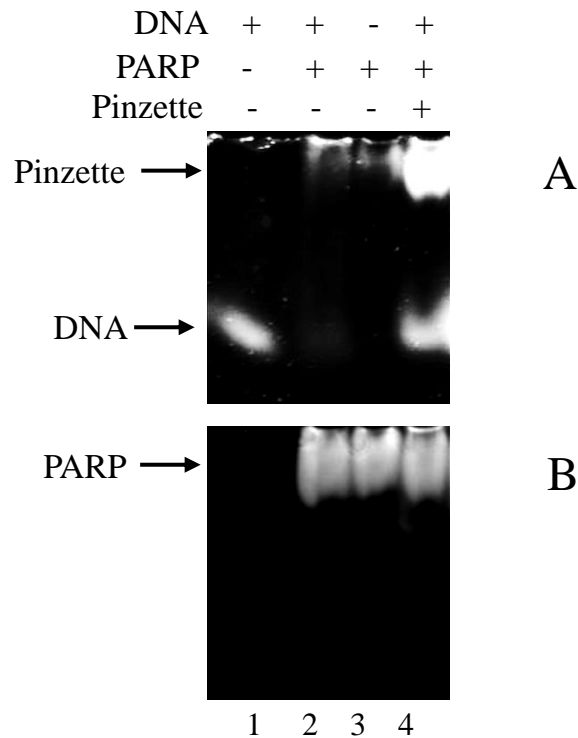


Abbildung 4.1.1: Gel 1 mit aktiver DNA, PARP-1 und Bisphosphatpinzette. Jeweilige Bestandteile der Kammern sind mit (+) und (-) gekennzeichnet. A: Gel 1 nach DNA-Färbung mit SYBR[®] Green ($\lambda = 255$ nm), die Pinzette wurde ebenfalls durch SYBR[®] Green angefärbt, B: Gel 1 nach Proteinfärbung mit SYPRO[®] Ruby ($\lambda = 285$ nm).

Ferner wurde mit Hilfe des EMSAs gezeigt, dass nur aktive DNA mit Einzelstrangbruch am PARP-1 gebunden wird. Weitere Untersuchungen zeigten auch, dass die Pinzette nicht an der DNA selber bindet. Wird aus dem PARP-1 das Zink herausdialysiert, welches zu einer Konformationsänderung des Zinkfingers führt, wird im Gel eine Bindung der Pinzette an dem Enzym durch das Anfärben mit SYBR[®] Green deutlich. Zudem kann bei der Spur des dialysierten PARP-1 mit aktiver DNA eine leichte Bande auf Höhe der DNA erkannt werden. Die Bande ist aus dem Grunde nicht so stark ausgeprägt, da zusätzlich zu den Zinkfingern die DNA auch durch die HTH-Einheit gebunden werden kann. Aber es ist deutlich, dass die DNA nicht mehr an den veränderten Zinkfingermotiven binden kann. Bei der Färbung mit SYPRO[®] Ruby wird auch noch einmal die Veränderung des Enzyms deutlich, da es nach der Dialyse ein anderes Laufverhalten im Gel aufweist.

Durch den EMSA wurde nun eindeutig gezeigt, dass die Hemmung der Phosphatpinzette darin besteht, dass sie durch Komplexbildung eines Lysins am Zinkfinger die DNA von diesem verdrängt.

Da die Kinetikmessungen bislang nur mit einer Phosphatpinzettenkonzentration durchgeführt wurden, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit auch diese näher untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Hemmung des PARP-1 durch die Phosphatpinzette **22** bei unterschiedlichen Konzentrationen immer einem nicht kompetitiven Hemmmechanismus unterliegt, wie es bereits durch *Talbiersky* für geringe Konzentrationen an **22** festgestellt wurde. Die Phosphatpinzette bindet, somit sowohl am PARP-1 selber als auch am Enzym-Substrat-Komplex. **22** verhindert durch die Komplexbildung basischer Aminosäuren an der PARP-1-Oberfläche die Umsetzung des NAD^+ und die Reparatur der aktiven DNA.

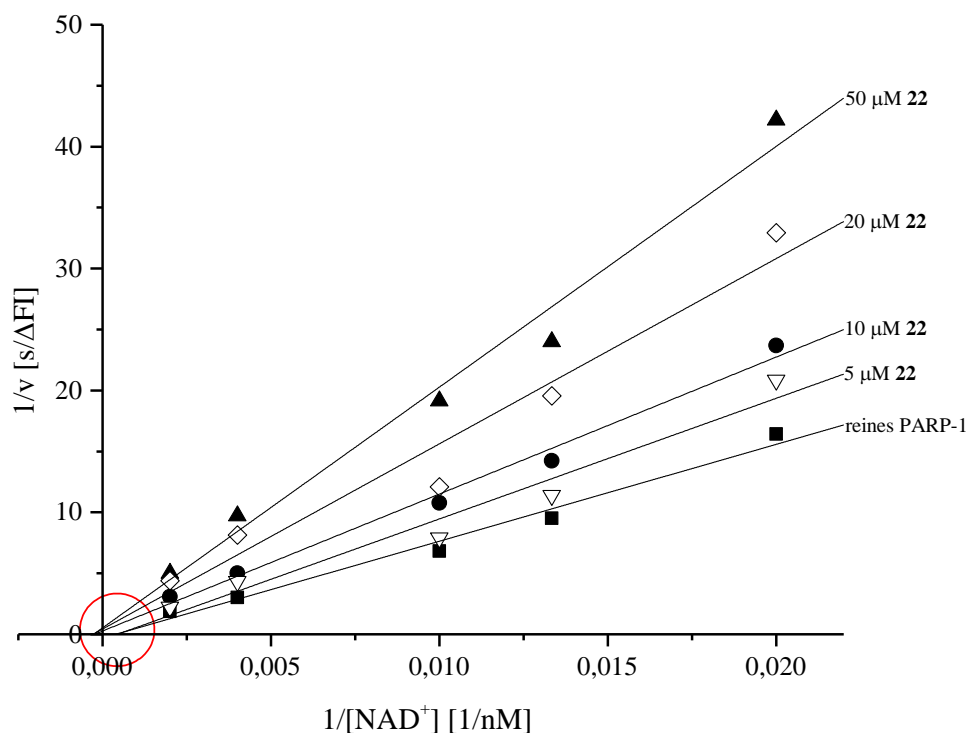


Abbildung 4.1.2: Lineweaver-Burk Plot des nativen PARP-1 und mit verschiedenen Konzentrationen an Phosphatpinzette **22**.

Enzymkinetische Untersuchungen mit Variation an DNA-Konzentrationen zeigten, dass die Enzymhemmung der Pinzette nicht kompetitiv gegenüber der DNA als Substrat ist. Die Pinzette hemmt durch die Bindung an dem DNA-Enzym-Komplex mit folgender DNA-

Verdrängung oder durch die Bindung am PARP-1 selber, so dass die DNA nicht gebunden werden kann. Dies bestätigt die durch den EMSA ermittelten Ergebnisse.

Als weiteres Enzym wurde im Rahmen dieser Arbeit die Hemmung der Glucose-6-phosphat Dehydrogenase (G6PD) mit der Phosphatpinzette **22** untersucht. *Talbiersky* hat bereits im Rahmen seiner Arbeit in Kooperation mit *Kirsch* die Hemmung der G6PD mit der Phosphatklammer untersucht. Die Hemmung durch die Phosphatpinzette liefert einen IC_{50} Wert von $1.0 \mu M$. Dies lässt auf einen speziellen Bindungsmechanismus schließen. Enzymkinetische Untersuchungen sollten über den genauen Bindungsmechanismus Aufschluss geben. Der Hemmmechanismus in Bezug auf die Variation an Cofaktor-Konzentrationen zeigt einen unkompetitiven Hemmmechanismus. Die Phosphatpinzette bindet ausschließlich an dem Enzym-Cofaktor-Komplex und verhindert den Umsatz des Cofaktors. Bei den enzymkinetischen Untersuchungen mit Variation an Substratkonzentration liegt wiederum ein „mixed-inhibition“ Mechanismus vor. Bei geringen Konzentrationen an Phosphatpinzette hemmt diese in einem unkompetitiven Hemmmechanismus gegenüber der Substratkonzentration, dass durch eine Bindung von **22** an dem Enzym-Substrat Komplex durch Hemmung des Substratumsatzes geschieht. Bei hohen Pinzettenkonzentrationen liegt ein nicht kompetitiver Hemmmechanismus vor. Bei hohen Konzentrationen an Pinzette bindet diese zusätzlich zu dem Enzym-Substrat-Komplex an dem reinen Enzym. Das Enzym ist somit zwar in der Lage Substrat zu binden, kann dieses jedoch nicht weiter umsetzen. Reaktivierungsexperimente durch die Zugabe von Cofaktor, bzw. Substrat könnten über den genauen Bindungsort der Pinzette und den genauen Bindungsmechanismus Aufschluss geben. Mikrokolorimetrische Untersuchungen der G6PD mit der Phosphatpinzette zeigten eine deutliche Wärmekurve. Eine Auswertung dieser lieferte Dissoziationskonstanten und thermodynamische Daten in der gleichen Größenordnung. Die Komplexbildung zwischen G6PD und **22** verläuft thermodynamisch bevorzugt ab. Als Stöchiometrie wurde ein 1:5, bzw. 1:4 Verhältnis (G6PD:**22**) ermittelt.

Ein weiterer Bestand dieser Arbeit war die Synthese neuer molekularer Pinzetten. In diesem Rahmen wurden Pinzetten mit verschiedenen Anionen, sowie auch unsymmetrische Pinzetten entwickelt. Die Carboxylmethylpinzette **24** besitzt als Anion ein Carboxylat und zeigt einen deutlichen Unterschied im Bindungsverhalten zu der bereits mehrfach untersuchten Phosphatpinzette **22**. Die Carboxymethylpinzette **24** unterliegt einer Eigendissoziation von

39 M^{-1} . ^1H -NMR-Untersuchungen mit Lysin- und Argininderivaten zeigen nur eine geringe Verschiebung der Protonen der Aminosäureseitenkette, das auf eine schwache Komplexierung hindeutet. Die Dissoziationskonstanten zeigen zudem eine geringe Bindungsaffinität. Untersuchungen mittels Fluoreszenztitration bestätigten diese schwache Bindungsaffinität. Da die Möglichkeit besteht, dass die Aminosäuren nicht in der Kavität der Pinzette gebunden vorliegen, sondern sich außerhalb der Pinzette durch die ionischen Wechselwirkungen anlagern können, wurden Molecular Modeling Strukturen ermittelt. Diese zeigten, dass die Aminosäure in der Kavität gebunden vorliegt, sowie auch Strukturen bei denen die Aminosäure außerhalb der Kavität gebunden wird. Die ermittelte Energiedifferenz der Strukturen ist so gering, dass sich nicht daraus schließen lässt, welche wahrscheinlich vorliegt. Die Bindungsaffinität der Carboxymethylpinzette **24** zu Arginin und Lysin muss folglich mit dem Anion in Verbindung stehen. Durch Bindungsstudien mit 1,8-Diaminooctan lässt sich die geringe Bindungsaffinität nicht auf die Länge der Carboxylatanionen zurückführen, sondern auf die Stärke der Wasserstoffbrückenbindungen. Ferner lässt sich vermuten, dass das Carboxylat die Öffnung der Kavität beeinträchtigt und somit die Komplexierung sterisch gehindert wird.

Ferner wurde die Methoxyphosphatpinzette **29** als unsymmetrische Pinzette im Rahmen dieser Arbeit dargestellt. Diese sollte einen Überblick vermitteln, in welcher Weise Linker, bzw. Erkennungseinheiten für andere Aminosäuren an die Pinzette angebracht werden können. Diese Methoxyphosphatpinzette zeigt nach den Fluoreszenztitrationen eine hohe Bindungsaffinität zu Lysinderivaten, die beidseitig und einseitig an dem C-terminus geschützt vorliegen. Sie unterscheidet sich jedoch im direkten Vergleich mit der Monophosphatpinzette, die eine hohe Affinität zu einseitig geschützten Lysin- und Argininderivaten aufweist. Moleküldynamische Simulationen zeigten, dass die Methoxyphosphatpinzette im Gegensatz zu der Monophosphatpinzette keine weitere Wasserstoffbrückenbindung mit den einseitig geschützten Aminosäuren ausbilden kann. Die Methoxygruppe steht dazu sterisch ungünstig. Die höhere Affinität der Methoxypinzette zu Lysinderivaten liegt nach den Molecular Modeling Strukturen darin, dass diese in der Kavität gebunden und durch Wasserstoffbrückenbindung gehalten werden. Die Argininderivate hingegen werden durch die Wasserstoffbrückenbindungen der Guanidiniumgruppe mit dem Phosphat etwas aus der Kavität herausgezogen. Die reine Ethergruppe neigt zudem dazu, die Kavität der Pinzette für Gäste abzuschirmen und beeinträchtigt die Komplexierung dieser. Moleküldynamische Simulationen lassen darauf schließen, dass die Methoxygruppe bei Argininderivaten eine sterisch hinderliche Orientierung einnimmt und die Aminosäure aus der Kavität von **29**

gedrängt wird. Im Gegensatz zu dem Argininderivat scheint beim Lysinderivat die Methoxygruppe eine sterisch günstige Position einzunehmen und annähernd in der Lage ist, Wasserstoffbrückenbindungen vom Ethersauerstoff zur Aminosäure auszubilden.

Ferner wurde die Carboxymethylphosphatpinzette **34** im Rahmen dieser Arbeit untersucht, die als unsymmetrische Pinzette zwei verschiedene Anionen aufweist. Als solche besitzt sie nach ^1H -NMR Titrations-, sowie Fluoreszenztitrations eine Mittelstellung im Vergleich der Bindungsaffinitäten zwischen der reinen Carboxymethyl- und der reinen Phosphatpinzette (**24+22**). Sie ist somit eine typische Hybridverbindung. Bei den Molecular Modeling Strukturen wurde zudem eine bevorzugte Bindungsseite ermittelt. So richtet sich die Aminosäure so aus, dass die Seitenkette zu der Phosphatgruppe ausgerichtet ist und mit dieser Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden kann. Ferner lässt sich darauf schließen, dass die Wasserstoffbrückenbindung zu dem Carboxylat wesentlich schwächer und unattraktiver für die Guanidinium-, bzw. für die Aminogruppe der Seitenkette ist. Liegt die Carboxylatgruppe protoniert vor, wird die Bindungsaffinität nur im geringen Maße schwächer. Diese Schwächung ist nicht auf die Protonierung zur Säure zurückzuführen, sondern vielmehr auf das nun vorliegende einfach deprotonierte Phosphation. Das Carboxylat hat folglich nur einen sehr geringen Bestandteil an der Bindungsaffinität der Carboxymethylphosphatpinzette. Moleküldynamische Simulationen zeigten, dass die Wasserstoffbrückenbindung der Carboxylatgruppe zu der Aminogruppe der Aminosäure schnell bricht. Das Lysinderivat befindet sich weiterhin in der Kavität, das Argininderivat hingegen wird durch eine dreifache Wasserstoffbrückenbindung zum Phosphat aus der Kavität herausgezogen. Dadurch wird die bereits bei **24** vermutete schwache Ausprägung der Wasserstoffbrückenbindungen durch das Carboxylat bestätigt.

4.2 Ausblick

Der Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) hat bereits bewiesen, dass die Pinzette an den Zinkfingermotiven des PARP-1 bindet und dabei die DNA von diesen verdrängt. Eine weitere Möglichkeit dieses zu beweisen, wäre das Nutzen der Zinkfingerplasmide, die in der Literatur für den EMSA genutzt werden.^[134] Es könnte versucht werden Kristalle mit diesen

und der Phosphatpinzette zu ziehen und davon eine gut aufgelöste Kristallstruktur zu erhalten. Für dieses Vorhaben sollte über eine Kooperation nachgedacht werden.

Um die genaue Bindung der Phosphatpinzette an der G6PD zu ermitteln, könnten molekularbiologisch das Lysin 205, das eine wichtige Rolle bei der Substratbindung spielt, das Lysin 407, das zu der Dimerenbildung beiträgt und somit wichtig für die Aktivität des Enzyms ist oder das Arginin 246, das von großer Bedeutung bei der Bindung des NAD^+ in der Rossmann-Spalte ist, durch andere Aminosäuren ersetzt werden. Wäre dies geschehen, könnte die enzymkinetischen Untersuchungen und die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) der Pinzette ermittelt werden. Diese Untersuchungen sollten dann im Vergleich zu den bereits mit dem unveränderten Enzym ermittelten Werten Aufschluss über die Bindungsaffinität der Pinzette an diesen wichtigen Aminosäuren liefern. Es muss jedoch darauf geachtet werden, welchen Einfluss eine Mutation dieser drei Aminosäuren auf die Enzymaktivität hat und dieses ins Verhältnis gesetzt werden. Einen schnellen Überblick über den Bindungsort könnten Reaktivierungsexperimente durch die Zugabe von Cofaktor, bzw. Substrat liefern. Wenn das Enzym durch Substrat wieder reaktiviert werden kann, dann lässt das auf das Lysin 205 schließen. Bei der Reaktivierung durch den Cofaktor lässt es sich auf die Hemmung der Pinzette an dem Arginin 246 zurückführen, was wichtig für die Cofaktorbildung ist.

Ein weiteres interessantes Untersuchungsgebiet wären die Farnesyltransferasen. Die Farnesyltransferasen sind Enzyme, die Moleküle auf Ras-Proteine übertragen. Diese werden an der Zellmembran verankert. Eine Inhibition dieser Farnesyltransferasen würde den für Tumorzellen wichtigen Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg beeinträchtigen. Ras-Proteine regulieren das Zellwachstum. Gene dieser Familie sind folglich potentielle Onkogene, da sie durch Mutationen dereguliert werden können und die Tumorentstehung begünstigen. Untersuchungen haben ergeben, dass 20% aller menschlicher Tumore Mutationen im Ras-Gen aufweisen. Diese Mutationen erhöhen die Ras-Aktivierung, durch die eine verstärkte Bindung von Guanosintriphosphat (GTP) an Ras erfolgt. Das Tumorstadium wird nun begünstigt, da Ras die Kinase Raf aktiviert. Diese wiederum phosphoryliert die Kinase MEK, die ihrerseits die ERK-Kinase phosphoryliert. Die intrazelluläre Signaltransduktion ist somit vollzogen. Ferner würde eine Hemmung dieses Signalweges das Wachstum der Tumorzellen beeinträchtigen und eine neue Methode der Krebstherapie darstellen.^[148]

Ein weiteres Forschungsgebiet wäre die strukturelle Veränderung der Pinzette. Da nun bekannt ist, dass eine CH_2 -Gruppe an der Hydroxyspacereinheit der Pinzette die Kavität

verschließt, bzw. die Komplexierung von Gästen beeinträchtigt, muss über einen anderen Weg nachgedacht werden, Erkennungseinheiten an die Pinzette zu koppeln. Ein guter Ansatz wäre, diese Erkennungseinheiten über die Phosphatgruppe als Phosphatester zu binden. Die Phosphorylierung sollte dabei diesmal nicht, wie in dieser Arbeit bereits versucht, mit Phosphoroxotrichlorid und durch Zugabe eines Alkohols erfolgen, sondern mit einem Phosphoramidit, das bereits zur DNA-Basen Synthese genutzt wird. Der Vorteil, den dieser Ansatz birgt, ist, dass die Löslichkeit durch den Phosphorsäureester - im Gegensatz zur unsymmetrischen Pinzette mit nur einer Phosphatgruppe - erhöht wird.

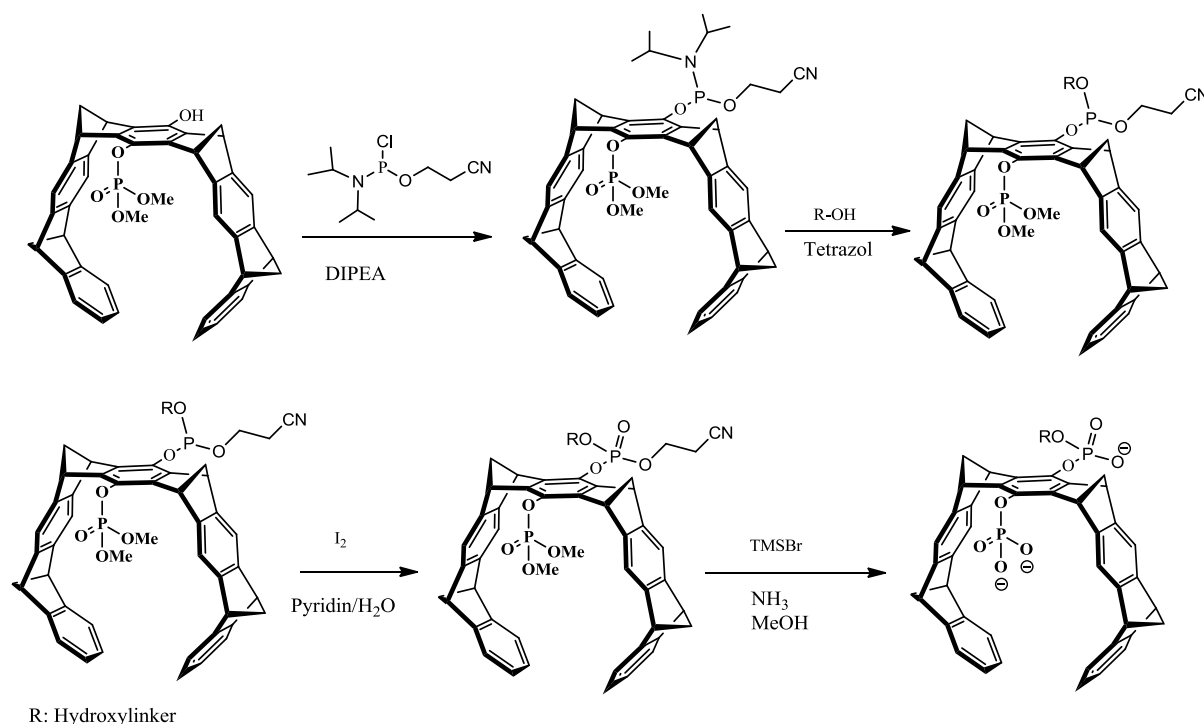


Abbildung 4.2.1: Syntheschema für eine unsymmetrische Pinzette mit Erkennungseinheit als Phosphorsäureester.

Zunächst müsste dazu die Monophosphatpinzette mit dem Phosphoramidit und Diisopropylethylamin umgesetzt werden. Den Alkohol kann nun durch die Zugabe von Tetrazol am Phosphor substituiert werden. Das Tetrazol fungiert hierbei, sowohl als schwache Säure zum Aktivieren des Isopropylrestes als Abgangsgruppe, sowie als nukleophiler Katalysator für die Substitution des Hydroxylinkers am Phosphor. Der Phosphor-III wird danach mit Iod in Anwesenheit von Pyridin-Wasser zum Phosphor-V oxidiert. Die Phosphatschutzgruppe kann mit Ammoniak abgespalten werden. Um diesen Schritt und die Entschützung der Phosphorester in einem Schritt zu vereinen, kann auch ein Phosphoramidit genutzt werden, das als Phosphatschutzgruppe einen Methoxyester enthält. Diese

Synthesenart wurde bereits bis zur geschützten Form von *Dutt* in seiner Arbeit beschrieben. Um die Erkennungseinheit zu entwickeln, muss die Kristallstruktur des zu inhibierenden Enzyms genutzt werden. Die Erkennungseinheit sollte so aufgebaut werden, dass sie eine in der Nähe zu dem Lysin, bzw. Arginin befindlichen Aminosäure bindet. Untersuchungen sollten vorher mittels Molecular Modeling durchgeführt werden, damit ein Selbsteinschluss der Erkennungseinheit ausgeschlossen werden kann. Um die jeweilige Erkennungseinheit an dem Phosphat zu binden, wäre eine Möglichkeit einen Spacer zwischen Phosphat und Erkennungseinheit zu binden. Dieser Spacer könnte am Ende eine Aminogruppe aufweisen, mit der nun mittels Peptidsynthese Aminosäuren gebunden werden könnten.

Eine weitere Überlegung einen Linker an die Pinzette zu binden, wäre die Möglichkeit dies nicht über die Phosphateinheit, sondern über das Grundgerüst zu tun. Durch den Einsatz eines Heteroatoms als Knüpfungsstelle zwischen Pinzette und Linker könnte der Linker in einer richtigen Position gehalten und eine Komplexierung dessen verhindert werden. Als Seitenarmbaustein könnte das Produkt einer Diels-Alder Reaktion eines geschützten Pyrrolderivats mit einem Alkin genutzt werden. Ferner könnten Erkennungseinheiten an dem aromatischen System der Pinzette angebracht werden. Eine Verknüpfung von Carboxyestern und Nitrosubstituenten an der Seitenwänden durch Einsatz substituierter Indenverbindungen kann in Anlehnung an die bereits synthetisierten Klammern^[149] durchgeführt werden. Weitere Substitutionen an den Seitenwänden können mit einer elektrophilen aromatischen Substitution ermöglicht werden. So könnte zunächst eine Bromierung des Aromaten erfolgen, der dann durch einen Linker substituiert werden kann.

5. Experimenteller Teil

5.1 Chemikalien und Methoden

5.1.1 Chemikalien

Es wurden Chemikalien der Firmen *Sigma Aldrich*, *Fluka* und *Acros Organics* der Qualitäten *purris.*, *purrum* oder *p.a.* eingesetzt. Proteine, Aminosäuren und DNA-Oligos wurden bei *Bachem*, *Biozol* und *Metabion* erworben.

5.1.2 Lösungsmittel

Die verwendeten Lösungsmittel wurden vom Chemikalienlager der Universität Duisburg-Essen Standort Essen bezogen. Für die Dünnschicht- und Säulenchromatographie wurden die Lösungsmittel technischer Qualität destilliert, sowie Lösungsmittel p.a. Qualität verwendet. Wasserfreies Tetrahydrofuran wurde nach den üblichen Verfahren hergestellt. Die verwendeten absoluten Lösungsmittel Aceton, Acetonitril, Dichlormethan, *N,N*-Dimethylformamid, Methanol und Toluol wurden von den Firmen *Sigma Aldrich*, *Fluka* und *Acros Organics* in der Qualität *purris.* und *anhydrous* über Molekularsieb bezogen. Das eingesetzte Wasser war entionisiert und konnte bei Bedarf mittels einer PURELAB UHQ Anlage der Firma *ELGA Lab Water* noch einmal entionisiert werden (Bidest. Wasser).

5.1.3 Chromatographie

Die Dünnschichtchromatographie wurden mittels POLYGRAM Polyester DC-Mikroarten (Kieselgel: SIL G/UV₂₅₄, 0.25 mm) von der Firma *Macherey-Nagel* durchgeführt. Die Detektion erfolgte dabei im UV-Licht der Wellenlänge 254 nm. Für die präparative Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (40-63 µm, 230-400 mesh) der Firma *Macherey-Nagel* als stationäres Füllmaterial einer Fallsäule verwendet. Als Trägermaterial der Rohprodukte wurde *Celite*[®] 545 coarse eingesetzt. Die jeweiligen Angaben über die Eluentenverhältnisse beziehen sich auf deren Volumen.

5.1.4 Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte wurden mit einem *Melting Point B-540* der Firma *Büchi* in einer offenen Kapillare vermessen.

5.1.5 Infrarotspektroskopie

Die Infrarotspektren wurden mit einem *Varian 3100 FT-IR-Spektrometer* (Excalibur Series) aufgenommen. Die Messung der Proben erfolgte per ATR-Methode (Probenkopf *miRacle* der Firma *PIKE*) oder mit einem KBr-Pressling. Ölige Substanzen wurden als Film zwischen KBr- oder NaCl-Kristallen aufgenommen. Die Bezeichnung der jeweiligen Methode ist bei den Substanzen vermerkt. Die Charakterisierung der Verbindungen geschah durch die Angabe der spezifischen Schwingungen.

5.1.6 UV/Vis-Spektroskopie

Die UV/Vis-Spektren wurden mit einem *Jasco V-550 Spektrometer* in einem Wellenlängenbereich von 200 nm bis 700 nm aufgenommen. Das jeweilige Lösungsmittel ist angegeben.

5.1.7 Fluoreszenz-Spektroskopie

Die Fluoreszenz-Spektren wurden mit einem *Jasco FP-6500-Spektrofluorometer* aufgenommen. Die Lösungen wurde in einer Quarz-Rundküvette der Schichtdicke 1 cm vermessen.

5.1.8 Massenspektroskopie

Die hochaufgelösten Massenspektren wurden mittels Elektrospray-Ionisation (ESI) in einem *Bruker BioTOF III* Flugzeit-Spektrometer mit ESI-Ionenquelle vermessen.

5.1.9 Magnetische Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die Aufnahme der ^1H , ^{13}C und ^{31}P -Kernresonanzspektren wurden sowohl am *Bruker-Avance DMX300* (^1H = 300 MHz, ^{13}C = 75 MHz und ^{31}P = 122 MHz mit einem 5 mm QNP Probenkopf), sowie zur vollständigen Aufklärung neuer Verbindungen am *Bruker-Avance DRX500* (^1H = 500 MHz, ^{13}C = 125 MHz, ^{31}P = 203 MHz, DEPT 90, DEPT 135, gs-

COSY 90, gs-HMQC, gs-HMBC, gs-NOESY mit einem 5 mm QNP und einem 5 mm TBI Probenkopf) durchgeführt. Die angegebene chemische Verschiebung δ in den ^1H -NMR-Spektren bezieht sich auf das Restprotonensignal des verwendeten deuterierten Lösungsmittels. In den ^{13}C -NMR-Spektren wurde auf das ^{13}C -Signal des verwendeten Lösungsmittels kalibriert. Die chemische Verschiebung δ ist in *parts per million* (ppm) angegeben. Die ^{13}C -NMR-Spektren wurden ^1H -breitbandgekoppelt aufgenommen. Die Kopplungskonstanten für 2J -, 3J - und 4J -Kopplungen werden in Hertz (Hz) angegeben. Die Spinmultiplizität wird mit folgenden Abkürzungen angegeben: s = singulett, d = dublett, t = triplett, q = quartett, dd = dublett vom dublett, dt = dublett vom triplett und m = multipllett. Die Stereochemie unterscheidbarer ^1H -Kerne an demselben C-Atom werden durch die beiden Buchstaben i (innen liegend) und a (außen liegend) gekennzeichnet.

5.1.10 CD-Spektren

Die CD-Spektren wurden mit einem *J-810 Spektropolarimeter* der Firma *Jasco* aufgenommen.

5.1.11 Isotherme Mikrokolorimetrie (ITC)

Die isotherme Mikrokolorimetrie (ITC) wurde an dem Gerät *MicroCal VP-ITC* mit einer Referenzstärke von 10 $\mu\text{cal/s}$ mit Hilfe von Klaus Kowski durchgeführt.

5.1.12 Verwendete Puffer

Phosphatpuffer für die Fluoreszenzspektroskopie (100 mM)

In 250 mL H_2O wurden 3.00 g (25 mmol) Na_2HPO_4 , 3.55 g (25 mmol) NaH_2PO_4 , 0.164 g (1.75 mmol) $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ und 0.073 g (0.25 mmol) Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) gelöst und durch Zugabe von 10%iger NaOH-Lösung auf $\text{pH} = 7.6$ gebracht.

Phosphatpuffer für die Fluoreszenzspektroskopie (20 mM)

Aus zwei Stammlösungen von 65 mM KH_2PO_4 (A) und 65 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (B) wird ein Puffer mit $\text{pH} = 7.6$ hergestellt ($V_A = 11.5 \text{ mL}$, $V_B = 88.5 \text{ mL}$). Durch Verdünnung mit bidest. H_2O erhält man den 20 mM Phosphatpuffer.

10x TBE-Puffer für den EMSA (pH = 8.0)

Es wurden 54.5 g (0.45 mol) Tris-Base, 28.0 g (0.45 mol) Borsäure und 1.3 g (0.0045 mol) EDTA in 500 mL bidest. H₂O gelöst und mit HCl auf pH = 8.0 eingestellt.

PARP-Binding Puffer (pH = 8.0)

Für die Darstellung des 10x PARP-Binding Puffers wurden 18.2 g (0.5 mol) Tris-Base und 0.75 g (20 mmol) MgCl₂ in 300 mL bidest. H₂O gelöst und durch Zugabe von 1M HCl auf pH = 8.0 gestellt.

Tris-Puffer zur DNA-Generierung

Zur Darstellung des 10 mM Trispuffers wurde 121.21 mg (1 mmol) Tris-Base in 100 mL bidest. H₂O gelöst und mit 1M HCl auf pH = 7.5 eingestellt.

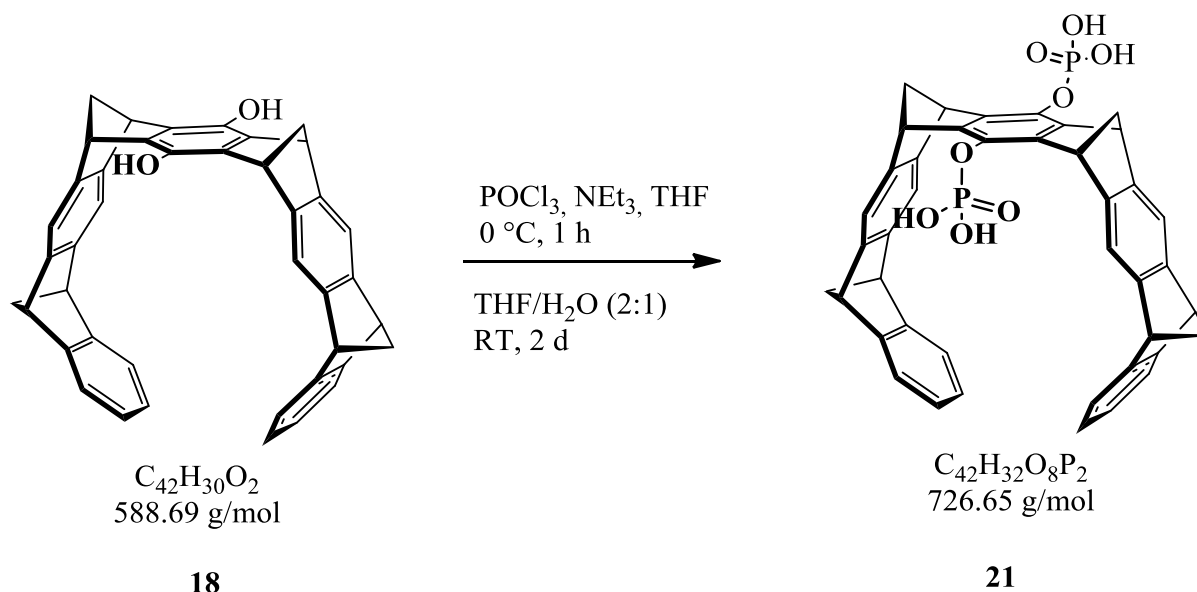
Tris-Puffer für die CD-Spektroskopie (20 mM)

Zur Darstellung des 20 mM Trispuffers wurden 4.85 g (0.04 mol) Tris-Base und 4.06 g MgCl₂ (0.02 mol) in 500 mL bidest. H₂O gelöst und mit 1M HCl auf pH = 7.52 eingestellt.

5.2 Synthesen

5.2.1 Synthese des Natriumsalzes der Bisphosphatpinzette

5.2.1.1 Darstellung von (5 α ,7 α ,9 α ,11 α ,16 α ,18 α ,20 α ,22 α)-5,7,9,11,16,18,20,22-octahydro-5,22:7,20:9,18:11,16-tetramethanononacen-8,19-bis-(dihydrogenphosphat) (21)

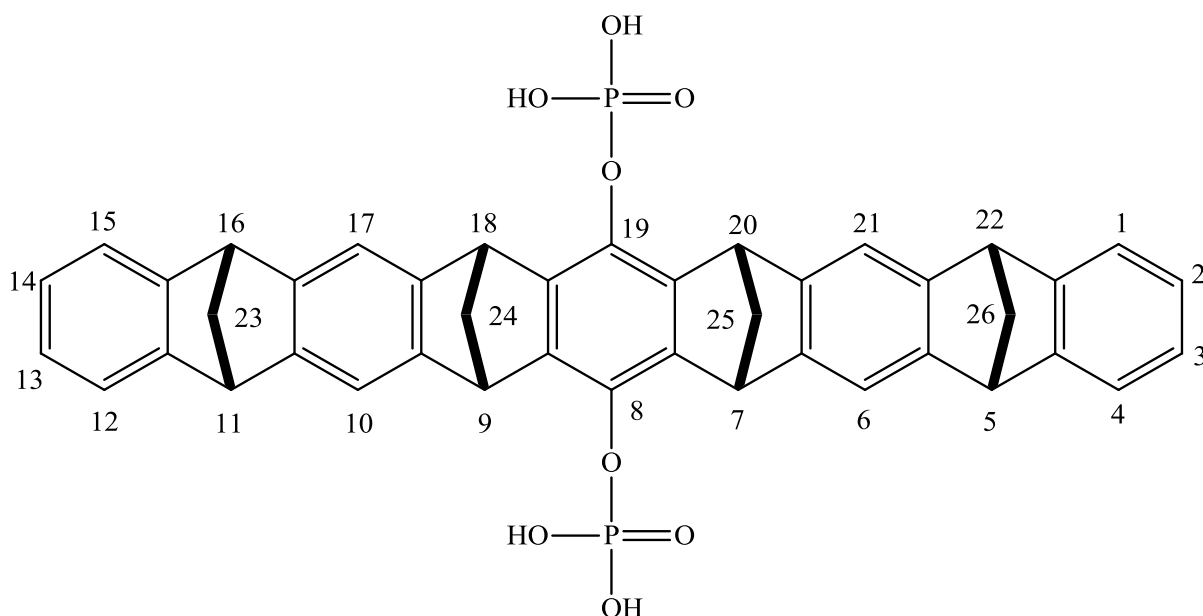


Durchführung:

200 mg (0.34 mmol) Hydroxypinzette **18** werden unter Schutzgas in 20 mL THF abs. gelöst und bei 0 °C mit 434 μ L $POCl_3$ (4.76 mmol) versetzt. Nach zehn Minuten wird 141 μ L (1.02 mmol) Triethylamin zu der Reaktionslösung gegeben und eine Stunde bei 0 °C gerührt. Die kalte Reaktionslösung wird mittels Filtration über eine D4-Fritte von dem farblosen Feststoff befreit und das Filtrat im Ölpumpenvakuum vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand, sowie die Fritte werden mehrmals mit 2.5%iger HCl gewaschen und das Zwischenprodukt mit einem THF/ H_2O -Gemisch (2:1) aus der Fritte gespült. Die gelbliche Lösung wird zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Das THF wird bei vermindertem Druck entfernt. Die Reaktionslösung wird mit 2.5%iger HCl nachgespült und für zehn Minuten im Ultraschallbad behandelt. Danach werden noch die verbliebenden THF-Reste aus der Reaktionslösung entfernt und noch einmal im Ultraschallbad behandelt. Der ausgefallene

Ausbeute: 240 mg (0.33 mmol, 97%)

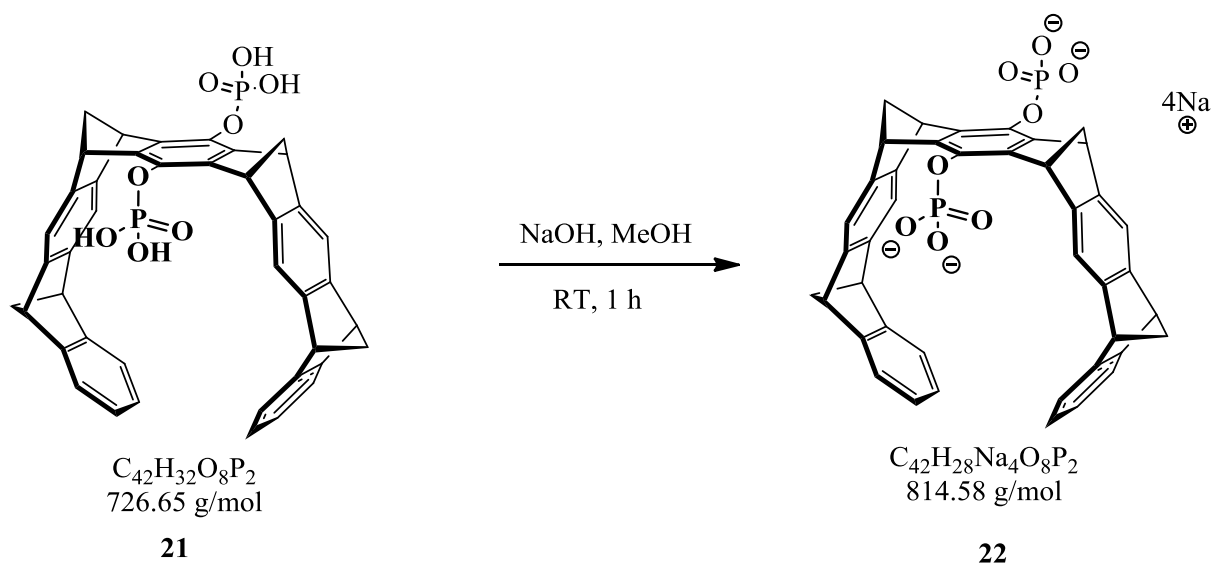
Schmelzpunkt: $> 200\text{ }^{\circ}\text{C}$ Zersetzung



¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = 150.80 (4a-C, 11a-C, 15a-C, 22a-C), 147.70 (5a-C, 10a-C, 16a-C, 21a-C), 147.07 (6a-C, 9a-C, 17a-C, 20a-C), 141.76 (7a-C, 8a-C, 18a-C, 19a-C), 138.56 (8-C, 19-C), 124.94 (2-C, 3-C, 13-C, 14-C), 121.89 (1-C, 4-C, 12-C, 15-C), 116.12 (6-C, 10-C, 17-C, 21-C), 68.45 (23-C, 26-C), 67.90 (24-C, 25-C), 51.22 (5-C, 11-C, 16-C, 22-C), 48.45 (7-C, 9-C, 18-C, 20-C).

$$^{31}\text{P-NMR (202 MHz, CD}_3\text{OD): } \delta [\text{ppm}] = -4.61.$$

5.2.1.2 Darstellung von Natrium-(5 α ,7 α ,9 α ,11 α ,16 α ,18 α ,20 α ,22 α)-5,7,9,11,16,18,20,22-octahydro-5,22:7,20:9,18:11,16-tetramethanononacen-8,19-bisphosphat (22)

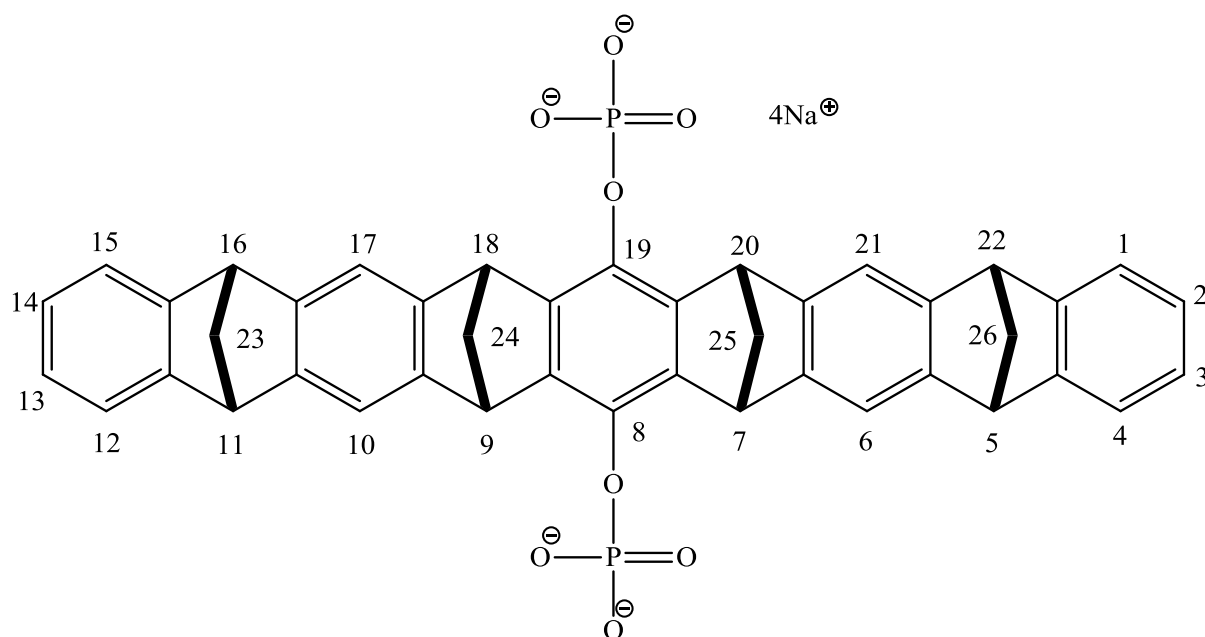


Durchführung:

Unter Schutzgas werden 239.8 mg (0.33 mmol) Hydrogenphosphatpinzette **21** in 20 mL Methanol abs. gelöst und mit 76.57 mg (1.32 mmol) Natriumhydroxid-Monohydrat versetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird bei vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand an der Ölpumpe für mehrere Stunden getrocknet.

Ausbeute: quantitativ

Schmelzpunkt: > 200 °C Zersetzung



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 7.28 (s, 4H, 6-H, 10-H, 17-H, 21-H), 7.14 (m, 4H, 1-H, 4-H, 12-H, 15-H), 6.77 (m, 4H, 2-H, 3-H, 13-H, 14-H), 4.50 (t, 4H, 27-H, 28-H), 4.18 (t, 4H, 7-H, 9-H, 18-H, 20-H), 2.55 (dt, 2H, $^2J_{24\text{a-H}/24\text{i-H}} = 7.5$ Hz, 24i-H, 25i-H), 2.36 (m, 4H, 23-H, 26-H), 2.25 (dt, 2H, $^2J_{25\text{a-H}/25\text{i-H}} = 7.5$ Hz, 24a-H, 25a-H).

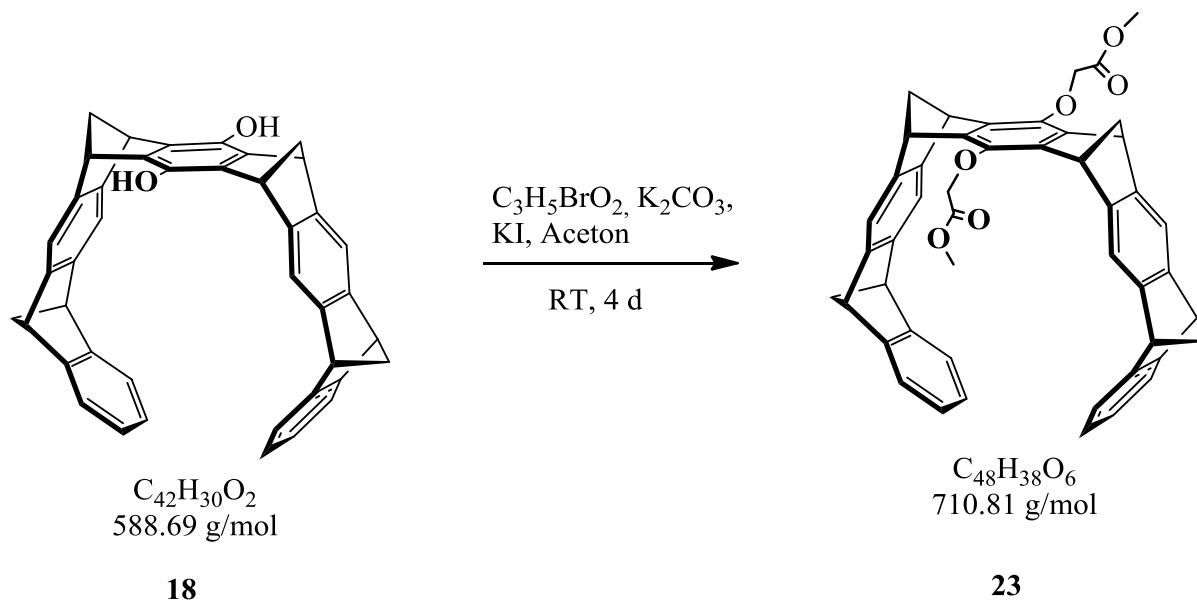
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, D_2O): δ [ppm] = 151.65 (4a-C, 11a-C, 15a-C, 22a-C), 149.13 (5a-C, 10a-C, 16a-C, 21a-C), 148.68 (6a-C, 9a-C, 17a-C, 20a-C), 142.07 (7a-C, 8a-C, 18a-C, 19a-C), 139.40 (8-C, 19-C), 121.19 (2-C, 3-C, 13-C, 14-C), 120.24 (1-C, 4-C, 12-C, 15-C), 116.43 (6-C, 10-C, 17-C, 21-C), 68.74 (23-C, 26-C), 68.57 (24-C, 25-C), 51.04 (5-C, 11-C, 16-C, 22-C), 47.98 (7-C, 9-C, 18-C, 20-C).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, D_2O): δ [ppm] = 0.99.

HRMS: ESI- (480 eV) m/z (%) = 362.0721 gef. 362.071 ber.

5.2.2 Synthese des Natriumsalzes der Carboxymethylpinzette

5.2.2.1 Darstellung von 8,19-(Methylcarboxy)methoxy-(5 α ,7 α ,9 α ,11 α ,16 α ,18 α ,20 α ,22 α)-5,7,9,11,16,18,20,22-octahydro-5,22:7,20:9,18:11,16-tetramethanononacen (23)

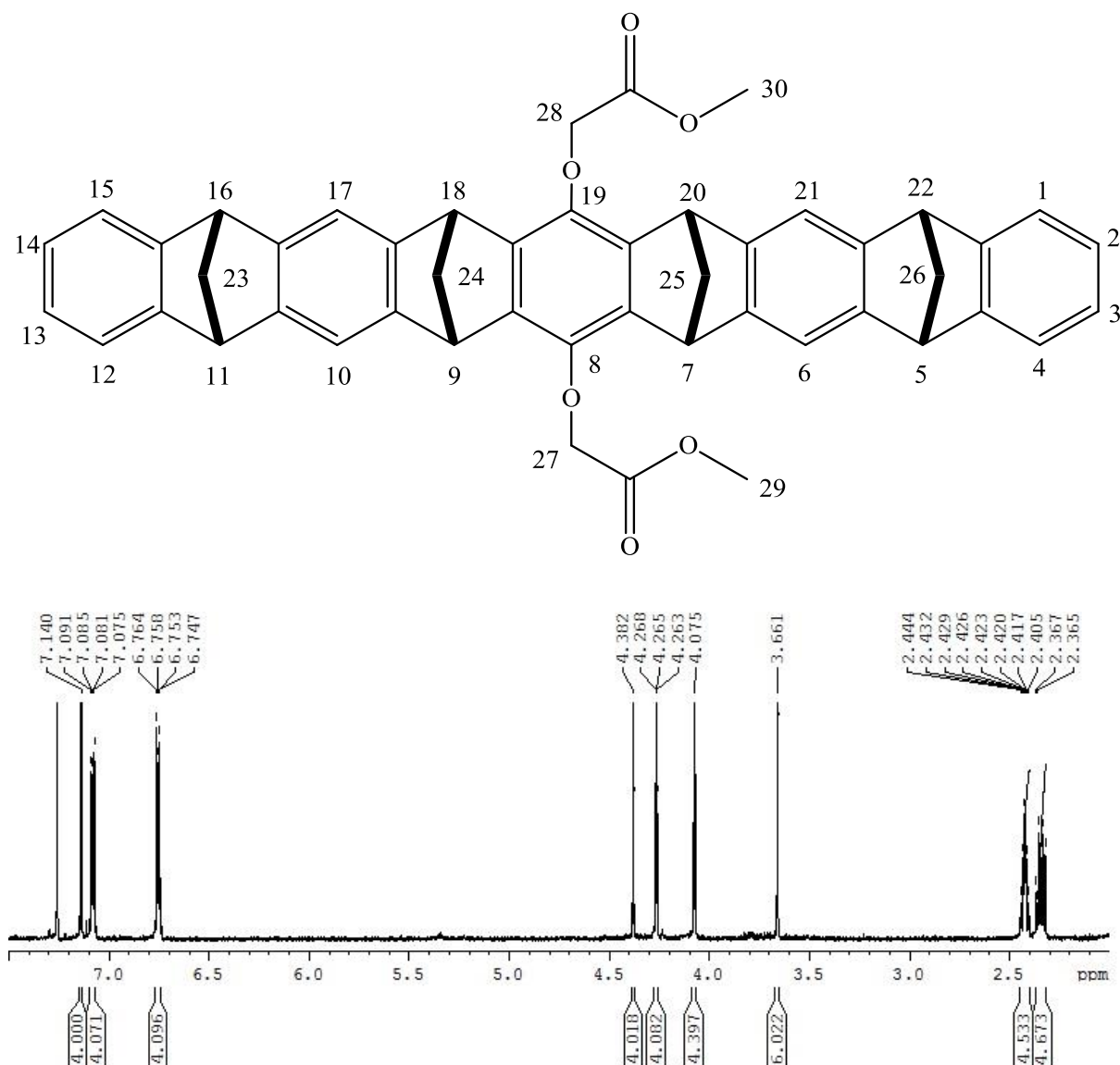


Durchführung:

20 mg (0.03 mmol) Hydroxypinzette **18** werden unter Schutzgas in 20 mL Aceton abs. gelöst und mit 0.013 mL (0.14 mmol) Methylbromacetat, 19.46 mg (0.14 mmol) Kaliumcarbonat und Kaliumiodid versetzt. Die Reaktionsmischung wird für vier Tage unter Schutzgas bei Raumtemperatur gerührt. Zur weiteren Aufarbeitung wird zu der Reaktionsmischung 50 mL Dichlormethan gegeben und diese nacheinander mit ges. NH_4Cl -Lösung, ges. NaHCO_3 -Lösung und H_2O gewaschen. Die org. Phase wird mit Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Das erhaltene Öl wird aus einem Gemisch von Chloroform/Aceton (1:1) umkristallisiert oder säulenchromatographisch (KG 60, CH/EE = 3:1) gereinigt.

Ausbeute: quantitativ

Schmelzpunkt: > 240 °C Zersetzung



^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.14 (s, 4H, 6-H, 10-H; 17-H, 21-H), 7.08 (m, 4H, 1-H, 4-H, 12-H, 15-H), 6.76 (m, 4H, 2-H, 3-H, 13-H, 14-H), 4.38 (s, 4H, 27-H, 28-H), 4.27 (m, 4H, 7-H, 9-H, 18-H, 20-H), 4.08 (m, 4H, 5-H, 11-H, 16-H, 22-H), 3.66 (s, 6H, 29-H, 30-H), 2.43 (m, 4H, 24-H, 25-H), 2.35 (m, 4H, 23-H, 26-H).

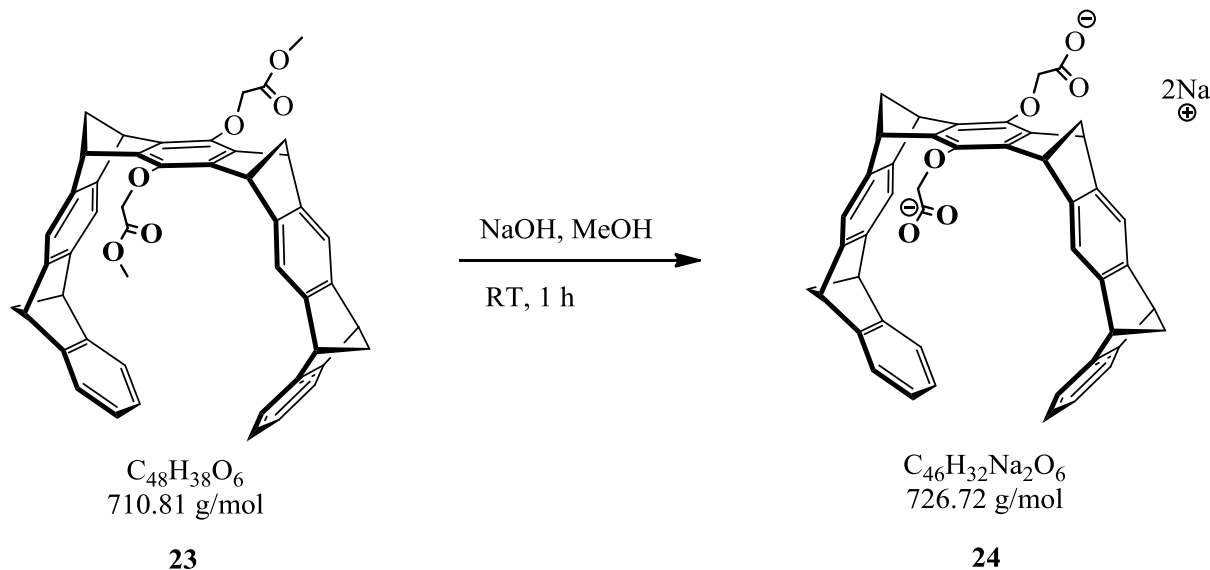
^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 170.09 (27a-C, 28a-C), 150.60 (4a-C, 11a-C, 15a-C, 22a-C), 147.80 (5a-C, 10a-C, 16a-C, 21a-C), 147.07 (6a-C, 9a-C, 17a-C, 20a-C), 144.48 (8-C, 19-C), 140.34 (7a-C, 8a-C, 18a-C, 19a-C), 124.75 (2-C, 3-C, 13-C, 14-C), 121.60 (1-C, 4-C, 12-C, 15-C), 116.39 (6-C, 10-C, 17-C, 21-C), 70.70 (27-C, 28-C), 69.90 (23-C, 26-C), 69.33 (24-C, 25-C), 51.46 (5-C, 11-C, 16-C, 22-C), 48.50 (7-C, 9-C, 18-C, 20-C), 14.35 (29-C, 30-C).

HRMS: ESI+ (480 eV) m/z (%) = 733.2657 gef. 733.2561ber. $[M+Na]^+$

IR (ATR) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: 2971 (C-H), 2838 (C-H), 1602 (C=O), 1423 (C-H), 979 (C-O).

5.2.2.2 Darstellung von Natrium-8,19-bismethylcarboxy-

(5 α ,7 α ,9 α ,11 α ,16 α ,18 α ,20 α ,22 α)-5,7,9,11,16,18,20,22-octahydro-
5,22:7,20:9,18:11,16-tetramethanononacen (24)

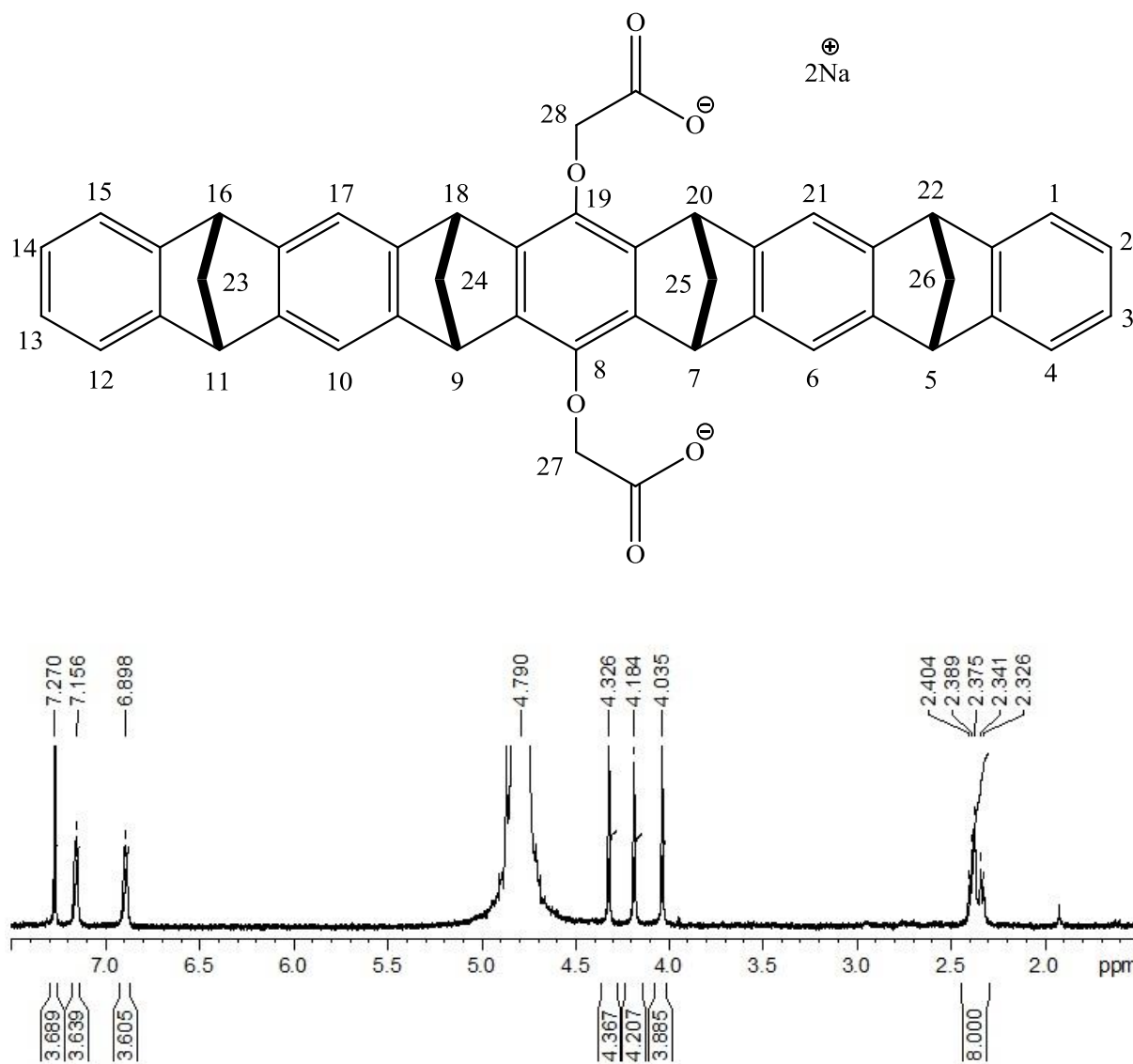


Durchführung:

Unter Schutzgas werden 29 mg (0.0408 mmol) Carboxymethylpinzette **23** in 5 mL Methanol abs. gelöst und mit 4.73 mg (0.0816 mmol) NaOH·Monohydrat versetzt. Die Reaktionsmischung wird für eine Stunde unter Schutzgas bei Raumtemperatur gerührt. Zur weiteren Aufarbeitung wird das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: quantitativ

Schmelzpunkt: > 255 °C Zersetzung



^1H -NMR (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 7.27 (s, 4H, 6-H, 10-H; 17-H, 21-H), 7.16 (br s, 4H, 1-H, 4-H, 12-H, 15-H), 6.75 (br s, 4H, 2-H, 3-H, 13-H, 14-H), 4.33 (s, 4H, 27-H, 28-H), 4.18 (s, 4H, 7-H, 9-H, 18-H, 20-H), 4.03 (s, 4H, 5-H, 11-H, 16-H, 22-H), 2.36 (m, 8H, 23-H, 24-H, 25-H, 26-H).

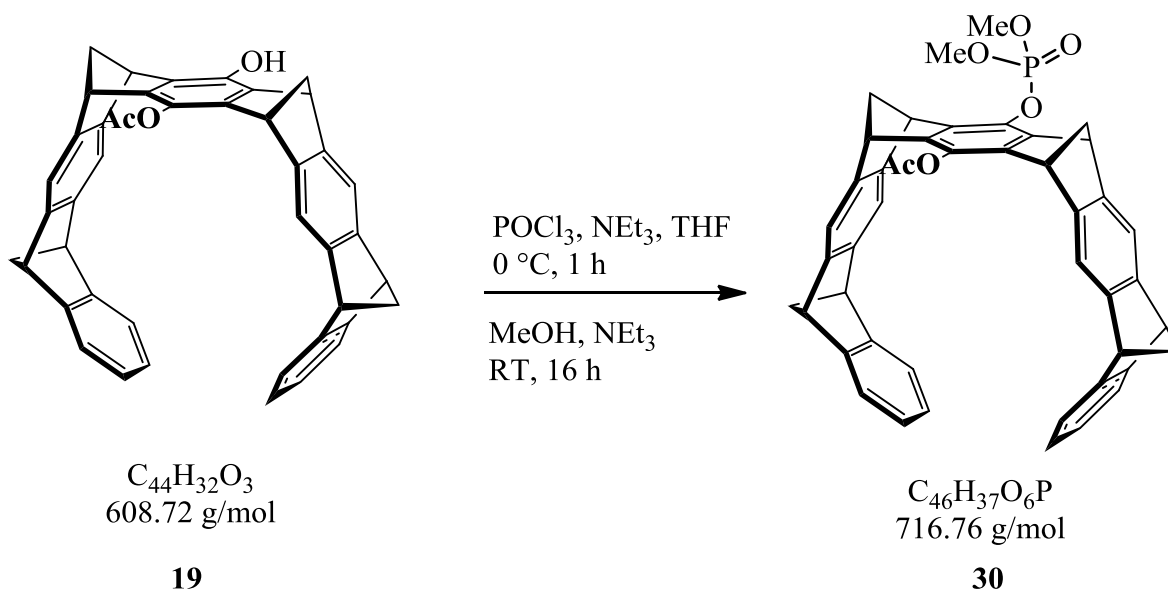
^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O): δ [ppm] = 177.04 (COO^-), 151.02 (4a-C, 11a-C, 15a-C, 22a-C), 148.53 (5a-C, 10a-C, 16a-C, 21a-C), 147.85 (6a-C, 9a-C, 17a-C, 20a-C), 143.64 (8-C, 19-C), 141.02 (7a-C, 8a-C, 18a-C, 19a-C), 125.19 (2-C, 3-C, 13-C, 14-C), 121.46 (1-C, 4-C, 12-C, 15-C), 116.24 (6-C, 10-C, 17-C, 21-C), 72.46 (27-C, 28-C), 68.27 (23-C, 26-C), 68.00 (24-C, 25-C), 50.75 (5-C, 11-C, 16-C, 22-C), 47.82 (7-C, 9-C, 18-C, 20-C).

IR (ATR) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]: 2973 (C-H), 2840 (C-H), 1601 (C=O), 1424 (C-H), 977 (C-O).

5.2.3 Synthese der Monophosphatpinzette

5.2.3.1 Darstellung von 19-Acetoxy-8-dimethylphosphat-

(5 α ,7 α ,9 α ,11 α ,16 α ,18 α ,20 α ,22 α)-5,7,9,11,16,18,20,22-octahydro-
5,22:7,20:9,18:11,16-tetramethanononacen (**30**)

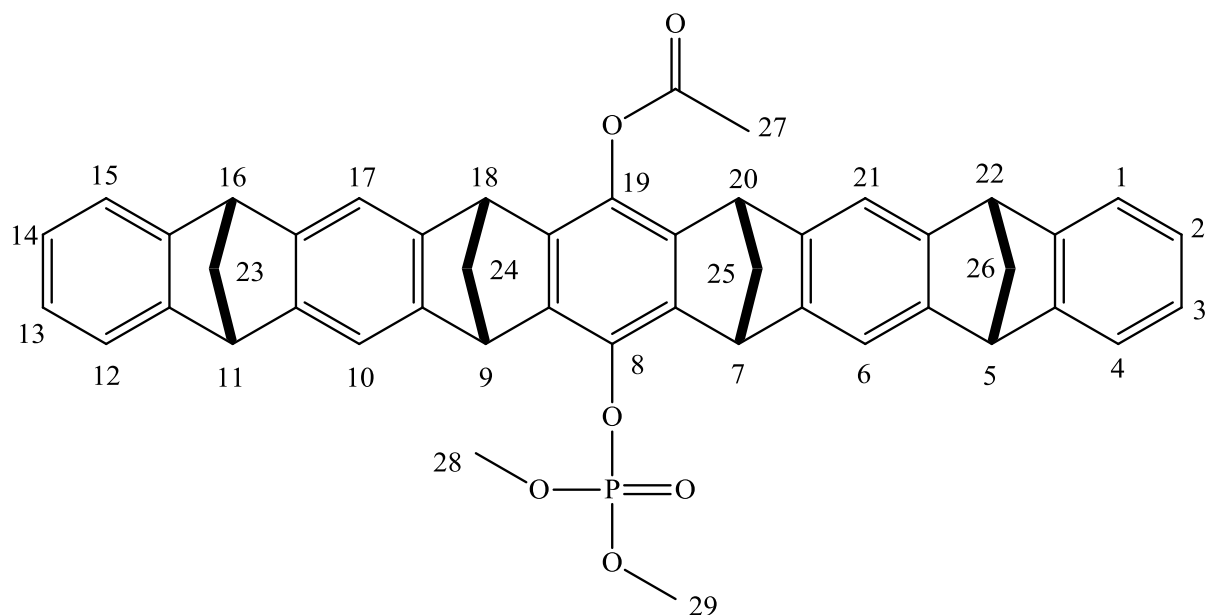


Durchführung:

200 mg (0.33 mmol) Monohydroxypinzette **19** werden unter Schutzgas in 20 mL THF abs. gelöst und bei 0 °C mit 615 μ L (6.6 mmol) POCl₃ versetzt. Nach zehn Minuten wird 915 μ L (6.6 mmol) Triethylamin zu der Reaktionslösung gegeben und eine Stunde bei 0 °C gerührt. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wird zu der Reaktionsmischung 5 mL MeOH abs. und 2.74 mL (19.8 mmol) Triethylamin gegeben und für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird bei vermindertem Druck abgezogen und der Rückstand mit 50 mL Chloroform aufgenommen. Die organische Lösung wird mit je 50 mL ges. NaHCO₃-Lösung, mit Wasser und mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (KG 60, CH/EE = 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 188 mg (0.26 mmol, 80%)

Schmelzpunkt: > 200 °C Zersetzung



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 7.22 (d, 2H, 6-H, 10-H), 7.10 (s, 2H, 17-H, 21-H), 7.07 (d, 2H, 4-H, 12-H), 7.03 (d, 2H, 1-H, 15-H), 6.74 (m, 4H, 2-H, 3-H, 13-H, 14-H), 4.40 (d, 2H, 7-H, 9-H), 4.06 (d, 4H, 5-H, 11-H, 16-H, 22-H), 3.95 (d, 2H, 18-H, 20-H), 3.22 (d, 6H, $^3J_{28\text{-H/P}, 29\text{-H-P}} = 10.8$ Hz, 28-H, 29-H), 2.46 (d, 2H, 24a-H, 25a-H), 2.42 (s, 4H, 23-H, 26-H), 2.34 (m, 5H, 24i-H, 25i-H, 27-H).

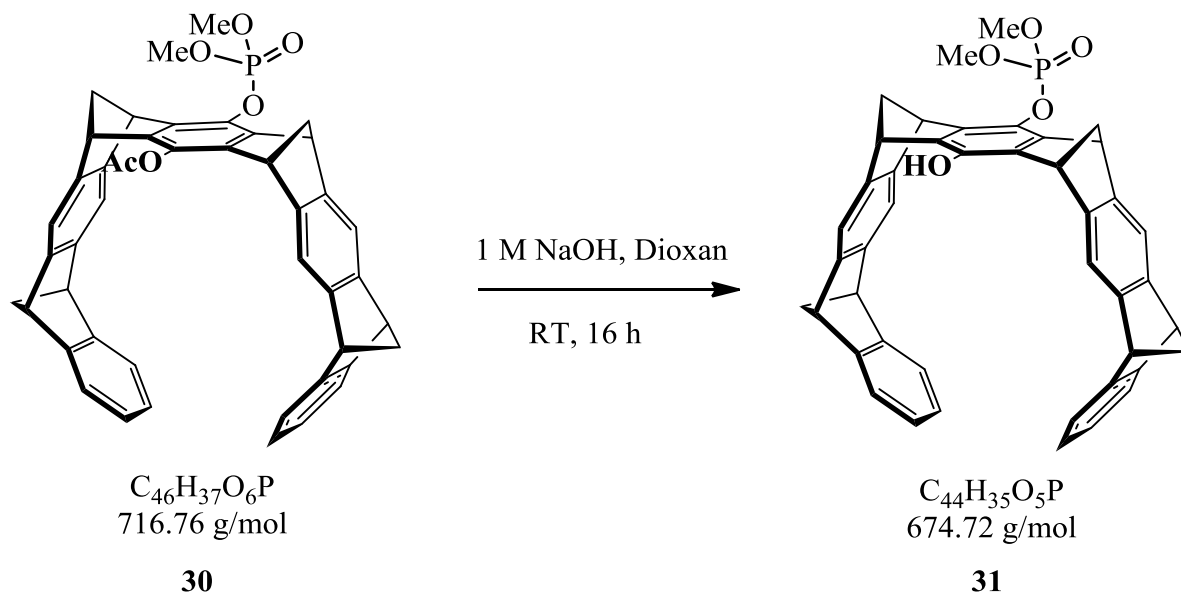
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = 168.56 (27a-C), 151.03 (4a-C, 11a-C, 15a-C, 22a-C), 148.17 (8-C, 19-C), 147.73 (6a-C, 9a-C, 17a-C, 20a-C), 141.76 (5a-C, 10a-C, 16a-C, 21a-C), 138.23 (7a-C, 8a-C, 18a-C, 19a-C), 125.43 (2-C, 3-C, 13-C, 14-C), 121.51 (1-C, 4-C, 12-C, 15-C), 118.56 (6-C, 10-C), 116.12 (17-C, 21-C), 69.14 (23-C, 26-C), 68.29 (24-C, 25-C), 54.76 (28-C, 29-C), 51.42 (5-C, 11-C, 16-C, 22-C), 48.57 (7-C, 9-C, 18-C, 20-C), 22.45 (27-C).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = -3.81.

HRMS: ESI+ (480 eV) m/z (%) = 739.2276 gef. 739.2220 ber. $[\text{M}+\text{Na}]^+$

5.2.3.2 Darstellung von 19-Hydroxy-8-dimethylphosphat-

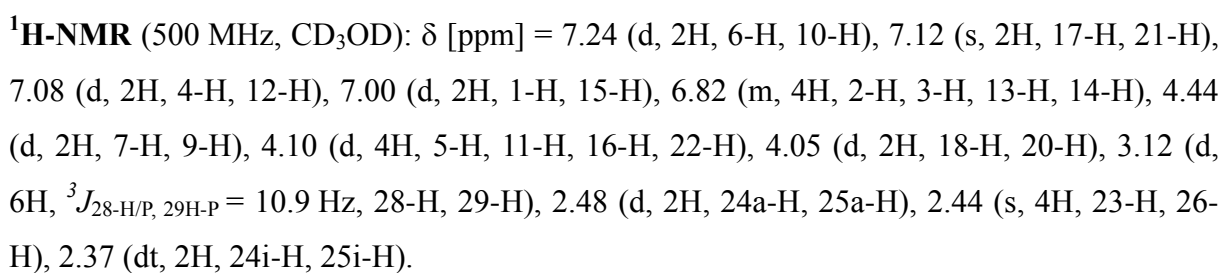
(5 α ,7 α ,9 α ,11 α ,16 α ,18 α ,20 α ,22 α)-5,7,9,11,16,18,20,22-octahydro-
5,22:7,20:9,18:11,16-tetramethanononacen (31)

**Durchführung:**

180 mg (0.251 mmol) Monophosphatpinzette **30** werden in 20 mL Dioxan gelöst und mit 2.5 mL einer 1M wässrigen NaOH-Lösung versetzt. Nach 16 Stunden starken Rührens wird die Reaktionsmischung auf 50 mL eines 1:1 Gemisches aus ges. NH₄Cl-Lösung und halbkonzentrierter HCl gegossen und dreimal mit je 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 100 mL H₂O gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: quantitativ

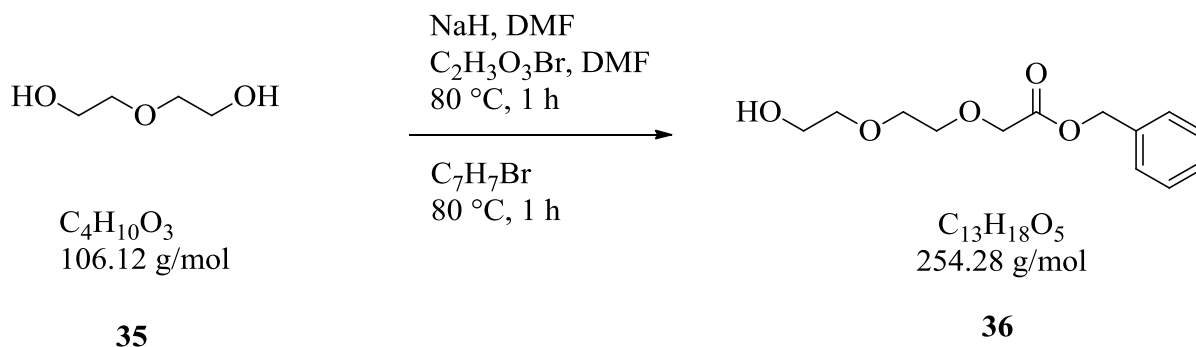
Schmelzpunkt: 238 °C


$$^{31}\text{P-NMR (202 MHz, CD}_3\text{OD): } \delta \text{ [ppm]} = -3.47.$$

HRMS: ESI+ (480 eV) m/z (%) = 697.2176 gef. 697.2114 ber. [M+Na]⁺

5.2.4 Synthese eines Glycollinkers

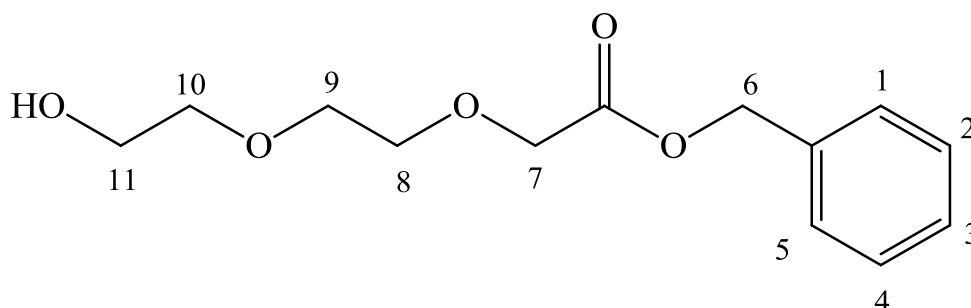
5.2.4.1 Darstellung von Benzyl-8-hydroxy-3,6-dioxaoctanoat (**36**)



Durchführung:

Unter Schutzgas werden 23 mL (240 mmol) Diethylenglykol **35** in 130 mL DMF abs. gelöst und portionsweise mit 4.8 g (120 mmol) NaH (60% in Paraffinöl) versetzt. Zu dieser Reaktionslösung werden 8.34 g (60 mmol) Bromessigsäure in 15 mL DMF abs. zugegeben und für eine Stunde bei 80 °C gerührt. Die Mischung wird auf Raumtemperatur abgekühlt und 6.88 mL (58 mmol) Benzylbromid zugegeben und abermals für eine Stunde bei 80 °C gerührt. Nachdem die Reaktionslösung auf Raumtemperatur abgekühlt ist, werden 100 mL Ethylacetat zugegeben und mit 500 mL 1M HCl extrahiert. Die wässrige Phase wird mit KCl (~ 30-40 g) gesättigt und zweimal mit 200 mL Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, zweimal mit 200 mL H₂O gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird bei vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (KG 60, EE) gereinigt.

Ausbeute: 3.26 g (12.8 mmol, 22%)

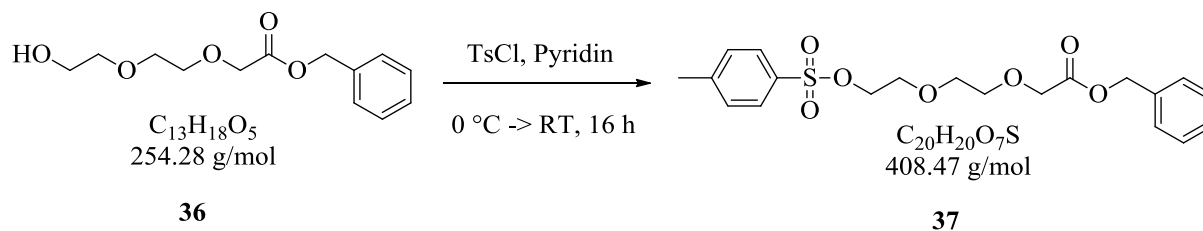


¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.36 (m, 5H, 1-H, 2-H, 3-H, 4-H, 5-H), 5.19 (s, 2H, 6-H), 4.69 (s, 1H, OH), 4.19 (s, 2H, 7-H), 3.72 (m, 6H, 8-H, 9-H, 10-H), 3.60 (m, 2H, 11-H).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 170.46 (C=O), 135.48 (1a-C), 128.77/128.69/128.63/127.78/127.12 (1-C, 2-C, 3-C, 4-C, 5-C), 72.69 (11-C), 71.23/70.52 (8-C, 9-C, 10-C), 68.77 (7-C), 66.79 (6-C), 61.88 (8-C, 9-C, 10-C).

HRMS: konnte massenspektrometrisch nicht nachgewiesen werden

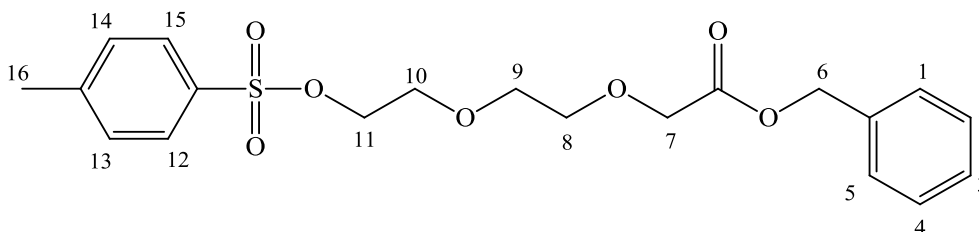
5.2.4.2 Darstellung von Benzyl-8-(4-toluenesulfonyloxy)-3,6-dioxaoctanoat (37)



Durchführung:

Es werden 180 mg (0.7 mmol) des Glykollinkers **36** in 10 mL Pyridin gelöst und auf $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Zu dieser Lösung werden nun portionsweise 270 mg (1.4 mmol) Tosylchlorid gegeben und über Nacht langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Die Reaktionslösung wird auf 40 mL eines Eis-Wasser-Gemischs gegossen, mit 10% HCl angesäuert und dreimal mit je 40 mL Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und zweimal mit 40 mL ges. NaHCO_3 -Lösung und dreimal mit je 40 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 142 mg (0.348 mmol, 50%)



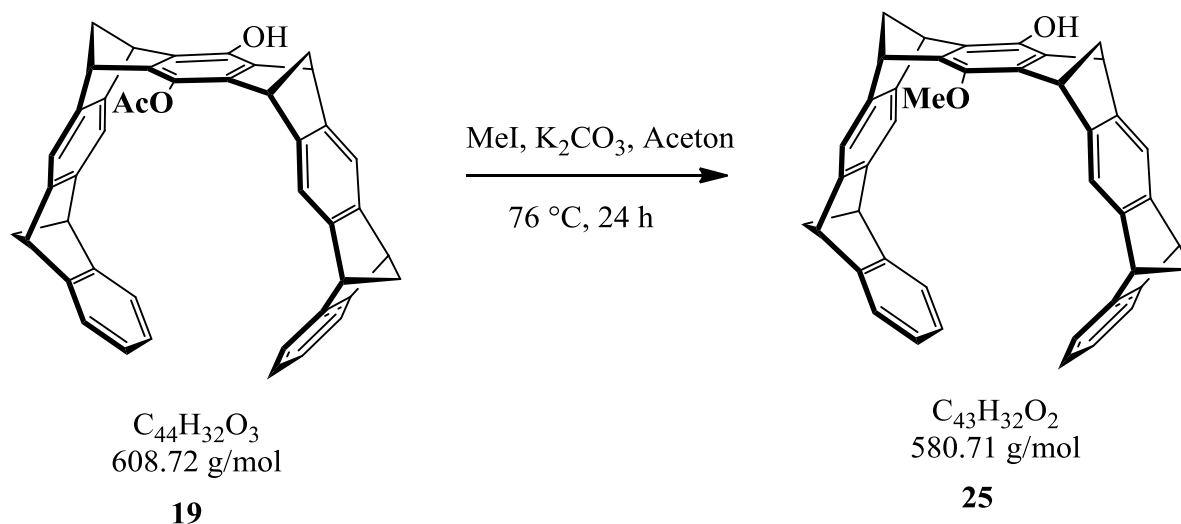
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.79 (d, 2H, $3J_{12\text{-H}/13\text{-H}} = 7.8\text{ Hz}$, 12-H, 15-H), 7.36 (m, 7H, 1-H, 2-H, 3-H, 4-H, 5-H, 13-H, 14-H), 5.19 (s, 2H, 6-H), 4.69 (s, 1H, OH), 4.14 (m, 2H, 7-H), 3.67 (m, 6H, 8-H, 9-H, 10-H), 3.61 (m, 2H, 11-H), 2.43 (s, 3H, 16-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 170.37 (C=O), 144.92 (12a-C), 135.54 (12-C), 133.15 (15-C), 130.02 (13-C), 129.94 (14-C), 128.75 (1a-C), 128.68 (1-C), 128.56/128.54 (2-C), 128.04 (3-C), 127.77 (4-C), 127.13 (5-C), 71.02 (7-C), 70.88 (6-C), 69.29 (8-C), 68.89 (9-C), 66.69 (10-C), 65.48 (11-C), 21.74 (16-C).

HRMS: konnte massenspektrometrisch nicht nachgewiesen werden

5.2.5 Synthesen der unsymmetrischen Pinzetten

5.2.5.1 Darstellung von 8-Hydroxy-19-methoxy-(5 α ,7 α ,9 α ,11 α ,16 α ,18 α ,20 α ,22 α)-5,7,9,11,16,18,20,22-octahydro-5,22:7,20:9,18:11,16-tetramethanononacen (**25**)

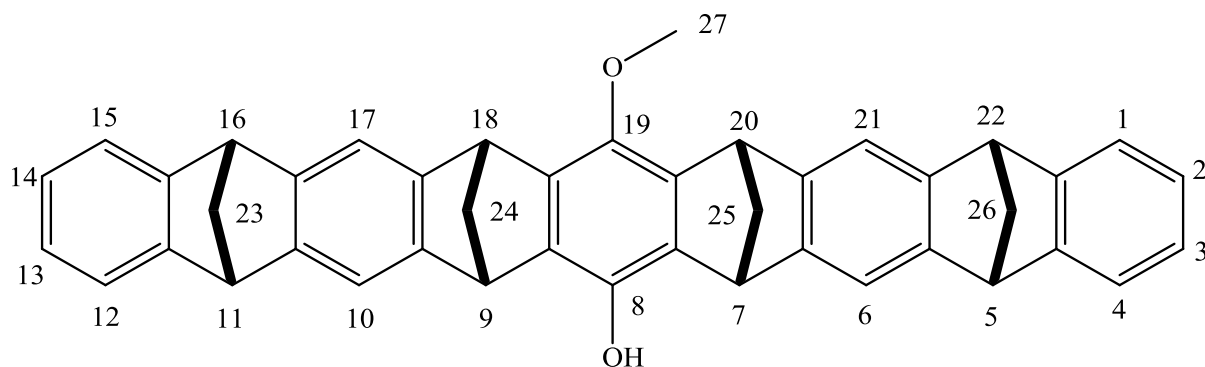


Durchführung:

88 mg (0.145 mmol) Monohydroxypinsette **19** werden unter Schutzgas in 10 mL Aceton abs. gelöst, mit 41.46 mg (0.3 mmol) Kaliumcarbonat und 0.1 mL Methyliodid versetzt und für 24 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen der Reaktionsmischung wird das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wird mit 15 mL 1,4-Dioxan aufgenommen, mit 1 mL 1M NaOH versetzt und für dreißig Minuten auf 80°C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Reaktionsmischung auf 30 mL 1M HCl gegossen und dreimal mit je 20 mL Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und noch mal mit je 50 mL H₂O, sowie ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, eingeeengt und der Rückstand säulenchromatographisch (KG 60, *n*H/EE = 3:1) gereinigt.

Ausbeute: 60 mg (0.103 mmol, 71%)

Schmelzpunkt: 210 °C



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.15 (s, 2H, H-6, H-10), 7.13 (s, 2H, H-17, H-21), 7.07 (m, 4H, H-1, H-4; H-12, H-15), 6.75 (m, 4H, H-2, H-3, H-13, H-14), 4.26 (s, 2H, H-7, H-9), 4.17 (m, 2H, H-18, H-20), 4.06 (s, 4H, H-5, H-11, H-16, H-22), 3.67 (s, 3H, H-27), 2.41 (d, 2H, $^2J_{24a-H/24i-H} = 7.8$ Hz, H-24, H-25), 2.39 (d, 2H, H-24, H-25), 2.36 (d, 2H, $^2J_{23a-H/23i-H} = 7.4$ Hz, H-23, H-26), 2.32 (d, 2H, H-23, H-26).

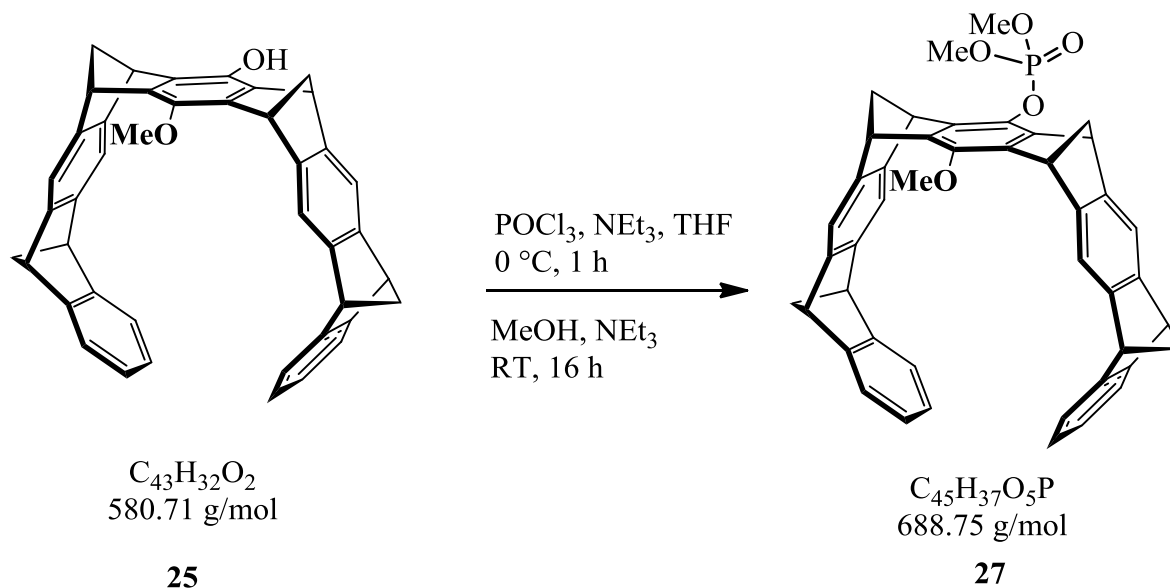
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 150.37 (4a-C, 11a-C), 150.29 (15a-C, 22a-C), 147.56 (5a-C, 10a-C), 147.47 (16a-C, 21a-C), 147.21 (6a-C, 9a-C, 17a-C, 20a-C), 143.97 (19-C), 140.81 (18a-C, 19a-C), 139.87 (7a-C, 8a-C), 134.69 (8-C), 124.68 (3-C, 13-C), 124.54 (2-C, 14-C), 121.67 (4-C, 12-C), 121.34 (1-C, 15-C), 116.81 (6-C, 10-C), 116.35 (17-C, 21-C), 69.96 (24-C, 25-C), 69.22 (23-C, 26-C), 61.76 (27-C), 51.40 (5-C, 11-C), 51.35 (16-C, 22-C), 48.38 (18-C, 20-C), 47.45 (7-C, 9-C).

HR-MS: ESI+ (480 eV) m/z (%) = 603.2293 gef. 603.2295 ber. $[\text{M}+\text{Na}]^+$

IR (ATR) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: 2971 (C-H), 2932 (C-H), 1484 (C-H), 1280 (O-H), 1054 (C-O-C).

5.2.5.2 Darstellung von 19-Methoxy-8-dimethylphosphat-

(5 α ,7 α ,9 α ,11 α ,16 α ,18 α ,20 α ,22 α)-5,7,9,11,16,18,20,22-octahydro-
5,22:7,20:9,18:11,16-tetramethanononacen (27)

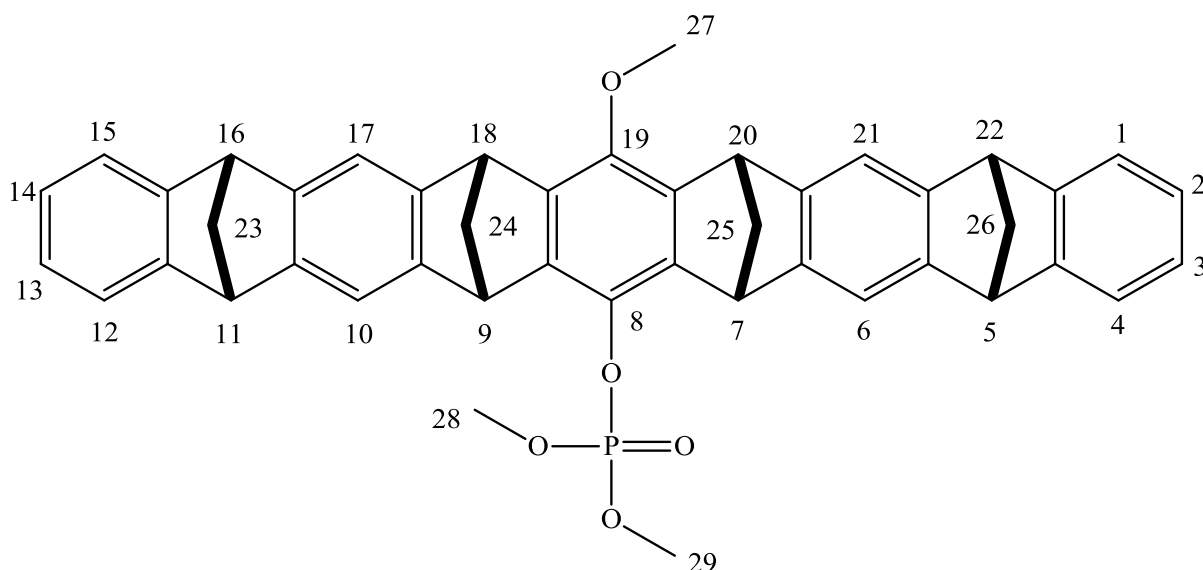


Durchführung:

Unter Schutzgas werden 10 mg (0.0164 mmol) Methoxyhydroxypinzette **25** in 20 mL THF abs. gelöst und auf 0 °C gekühlt. In der Kälte werden 0.022 mL (0.2464 mmol) Phosphoroxychlorid, sowie 0.023 mL (0.164 mmol) Triethylamin zugegeben und für eine Stunde stark gerührt. Die Reaktionslösung wird auf Raumtemperatur erwärmt, mit 2 mL Methanol abs. sowie 0.2 mL Triethylamin versetzt und für 16 Stunden bei Raumtemperatur unter Schutzgas gerührt. Zur weiteren Aufarbeitung wird das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand mit Chloroform aufgenommen und einmal mit ges. NaHCO_3 -Lösung, zweimal mit Wasser und einmal mit ges. NaCl -Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet, eingengt und der Rückstand säulenchromatographisch (KG 60, CH/EE = 1:1) gereinigt.

Ausbeute: 7 mg (0.0102 mmol, 62%)

Schmelzpunkt: > 200 °C Zersetzung



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.23 (s, 2H, 6-H, 10-H), 7.13 (s, 2H, 17-H, 21-H), 7.05 (m, 4H, 1-H, 4-H; 12-H, 15-H), 6.74 (m, 4H, 2-H, 3-H, 13-H, 14-H), 4.35 (m, 2H, 7-H, 9-H), 4.29 (m, 2H, 18-H, 20-H), 4.06 (m, 4H, 5-H, 11-H, 16-H, 22-H), 3.77 (s, 3H, 27-H), 3.41 (s, 3H, 29-H), 3.39 (s, 3H, 28-H), 2.42 (m, 4H, 24-H; 25-H), 2.37 (m, 4H, 23-H, 26-H).

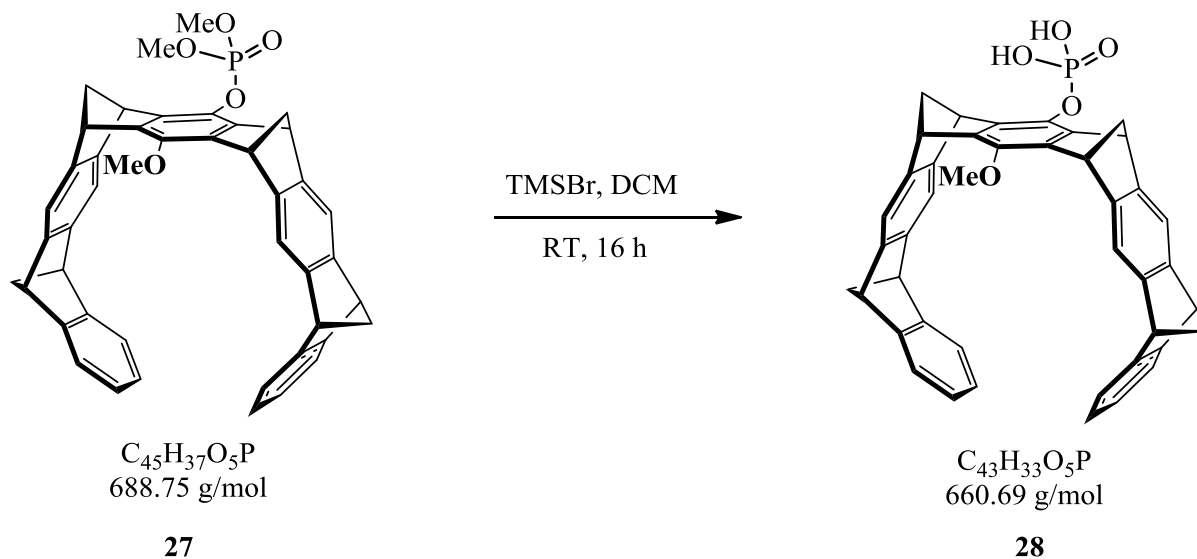
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 150.69 (4a-C, 11a-C), 150.59 (15a-C, 22a-C), 147.69 (5a-C, 10a-C), 147.66 (16a-C, 21a-C), 147.05 (6a-C, 9a-C, 17a-C, 20a-C), 140.99 (8-C), 140.97 (19-C), 134.87 (7a-C, 8a-C), 134.81 (18a-C, 19a-C), 124.77 (3-C, 13-C), 124.73 (2-C, 14-C), 121.71 (4-C, 12-C), 121.16 (1-C, 15-C), 117.21 (6-C, 10-C), 116.13 (17-C, 21-C), 69.64 (23-C, 26-C), 68.92 (24-C, 25-C), 61.47 (27-C), 54.99 (29-C), 54.94 (28-C), 51.40 (5-C, 11-C), 51.35 (16-C, 22-C), 48.68 (18-C, 20-C), 48.55 (7-C, 9-C).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = -3.56.

HR-MS:	ESI+ (480 eV)	m/z (%) = 711.2376 gef.	711.2271 ber.	$[\text{M}+\text{Na}]^+$
		m/z (%) = 734.3134 gef.	734.2174 ber.	$[\text{M}+2\text{Na}]^+$

5.2.5.3 Darstellung von 8-Dihydrogenphosphat-19-methoxy-

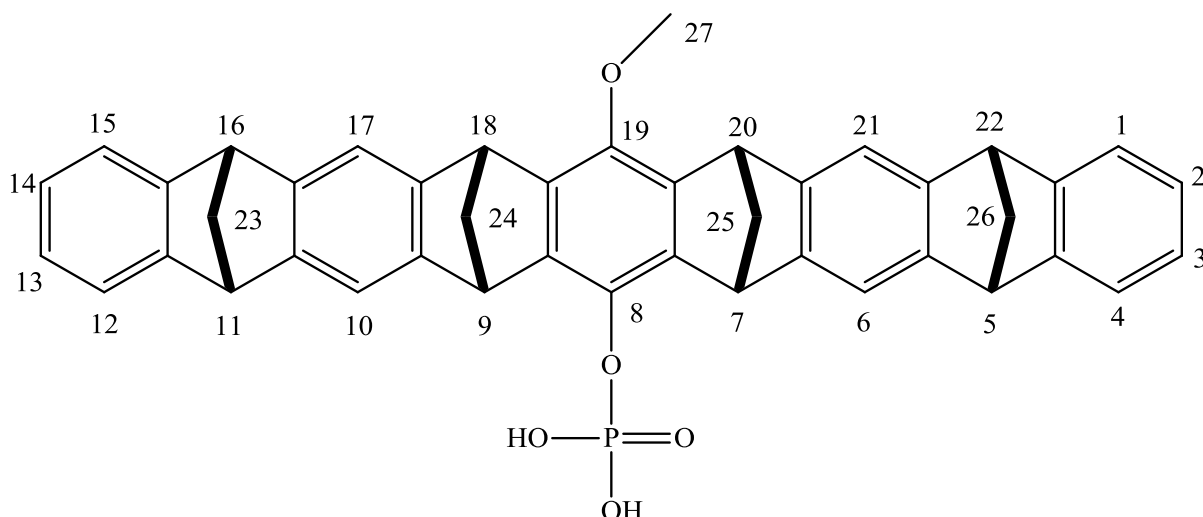
(5 α ,7 α ,9 α ,11 α ,16 α ,18 α ,20 α ,22 α)-5,7,9,11,16,18,20,22-octahydro-
5,22:7,20:9,18:11,16-tetramethanononacen (28)



Durchführung:

5 mg (0.00726 mmol) Methoxyphosphatpinzette **27** werden unter Schutzgas in 10 mL Dichlormethan abs. gelöst. Zu der Lösung wird 0.01 mL (0.0726 mmol) TMSBr gegeben und unter Schutzgas über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wird im Ölpumpenvakuum entfernt und der Rückstand für mehrere Stunden getrocknet. Der Rückstand wird in Dichlormethan aufgenommen, mit H₂O versetzt und für drei Tage stark gerührt. Die Phasen werden getrennt und die wässrige Phase noch dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden danach noch einmal mit H₂O gewaschen und ohne zu Trocknen vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 5 mg



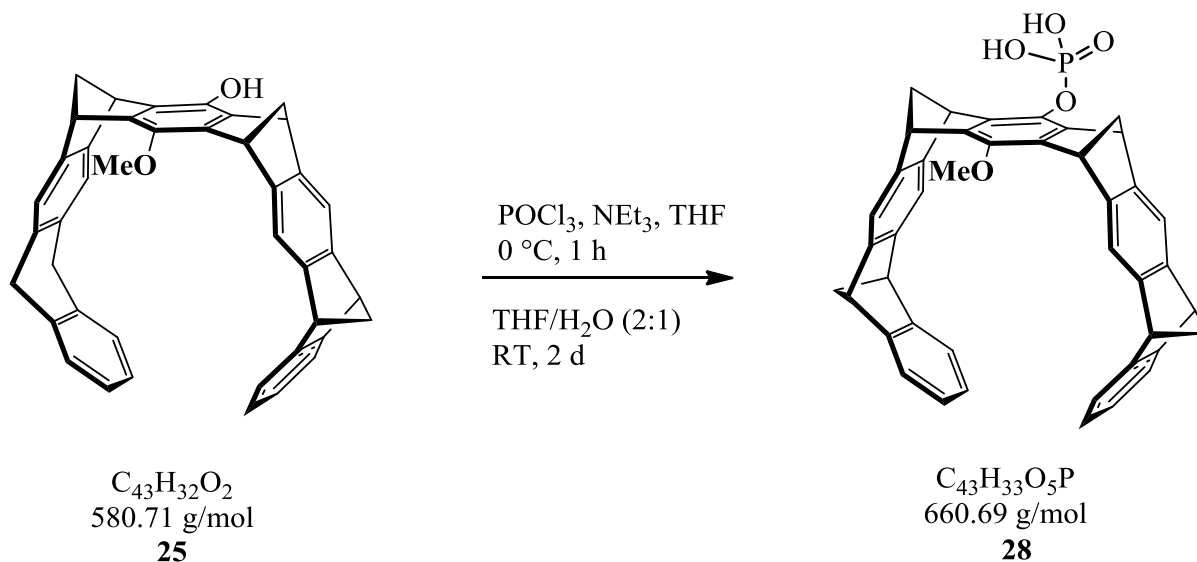
Das ^1H -NMR zeigt eine unvollständige Entschützung der Phosphatester, zudem eine Teilabspaltung der Methoxygruppe an der zentralen Spacereinheit:

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.22 (s, 2H, H-6, H-10), 7.12 (s, 2H, H-17, H-21), 7.07 (m, 4H, H-1, H-4; H-12, H-15), 6.73 (m, 4H, H-2, H-3, H-13, H-14), 4.34 (m, 2H, H-7, H-9), 4.28 (m, 2H, H-18, H-20), 4.06 (m, 4H, H-5, H-11, H-16, H-22), 3.77 (s, 1.5H, H-27), 3.41 (s, 1.5H, H-29), 3.37 (s, 1.5H, H-28), 2.35 (m, 8H, H-23, H-24; H-25, H-26).

^{31}P -NMR (121 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = -3.54.

5.2.5.4 Darstellung von 19-Methoxy-8-dihydrogenphosphat-

(5 α ,7 α ,9 α ,11 α ,16 α ,18 α ,20 α ,22 α)-5,7,9,11,16,18,20,22-octahydro-
5,22:7,20:9,18:11,16-tetramethanononacen (**28**)

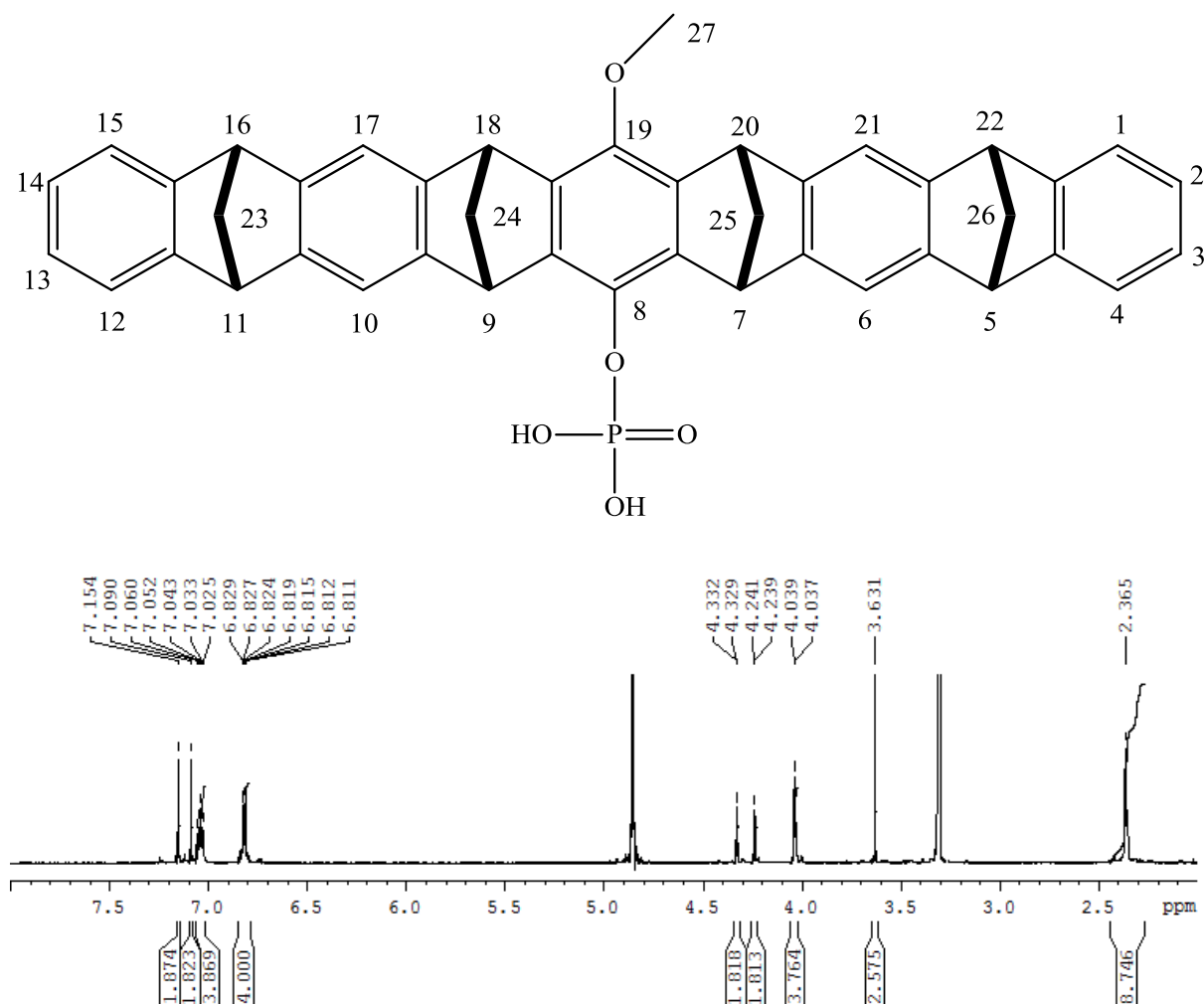


Durchführung:

95 mg (0.164 mmol) Methoxyhydroxypinzette **25** werden unter Schutzgas in 20 mL THF abs. gelöst und bei 0 °C mit 210 μL POCl_3 (2.3 mmol) versetzt. Nach zehn Minuten wird 70 μL (0.5 mmol) Triethylamin zu der Reaktionslösung gegeben und eine Stunde bei 0 °C gerührt. Die kalte Reaktionslösung wird mittels Filtration über eine D4-Fritte von dem farblosen Feststoff befreit und das Filtrat im Ölpumpenvakuum vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand, sowie die Fritte werden mehrmals mit 2.5%iger HCl gewaschen und das Zwischenprodukt mit einem THF/ H_2O -Gemisch (2:1) aus der Fritte gespült. Die gelbliche Lösung wird zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Das THF wird bei vermindertem Druck entfernt. Die Reaktionslösung wird mit 2.5%iger HCl nachgespült und für zehn Minuten im Ultraschallbad behandelt. Danach werden noch die verbliebenden THF-Reste aus der Reaktionslösung entfernt und noch einmal im Ultraschallbad behandelt. Der ausgefallene Feststoff wird über eine D4-Fritte abgesaugt und mehrmals mit 2.5%iger HCl gewaschen. Der Feststoff wird im Luftstrom getrocknet und mit Methanol aus der Fritte gelöst. Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt und der entstandene Feststoff im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 90 mg (0.136 mmol, 83%)

Schmelzpunkt: > 210 °C Zersetzung



^1H -NMR (500 MHz, CDOD_3): δ [ppm] = 7.15 (s, 2H, 6-H, 10-H), 7.09 (s, 2H, 17-H, 21-H), 7.04 (m, 4H, 1-H, 4-H; 12-H, 15-H), 6.82 (m, 4H, 2-H, 3-H, 13-H, 14-H), 4.33 (m, 2H, 7-H, 9-H), 4.24 (m, 2H, 18-H, 20-H), 4.03 (m, 4H, 5-H, 11-H, 16-H, 22-H), 3.63 (s, 3H, 27-H), 2.36 (m, 4H, 24-H; 25-H), 2.30 (m, 4H, 23-H, 26-H).

^{13}C -NMR (125 MHz, CDOD_3): δ [ppm] = 150.74 (4a-C, 11a-C), 150.69 (15a-C, 22a-C), 147.92 (5a-C, 10a-C), 147.49 (16a-C, 21a-C), 147.44 (6a-C, 9a-C, 17a-C, 20a-C), 141.43 (8-C), 141.40 (19-C), 140.82 (7a-C, 8a-C, 18a-C, 19a-C), 124.62 (3-C, 13-C), 124.60 (2-C, 14-C), 120.82 (4-C, 12-C), 120.57 (1-C, 15-C), 116.57 (6-C, 10-C), 114.95 (17-C, 21-C), 67.64 (23-C, 26-C), 67.53 (24-C, 25-C), 60.39 (27-C), 50.96 (5-C, 7-C, 9-C, 11-C, 16-C, 18-C, 20-C, 22-C).

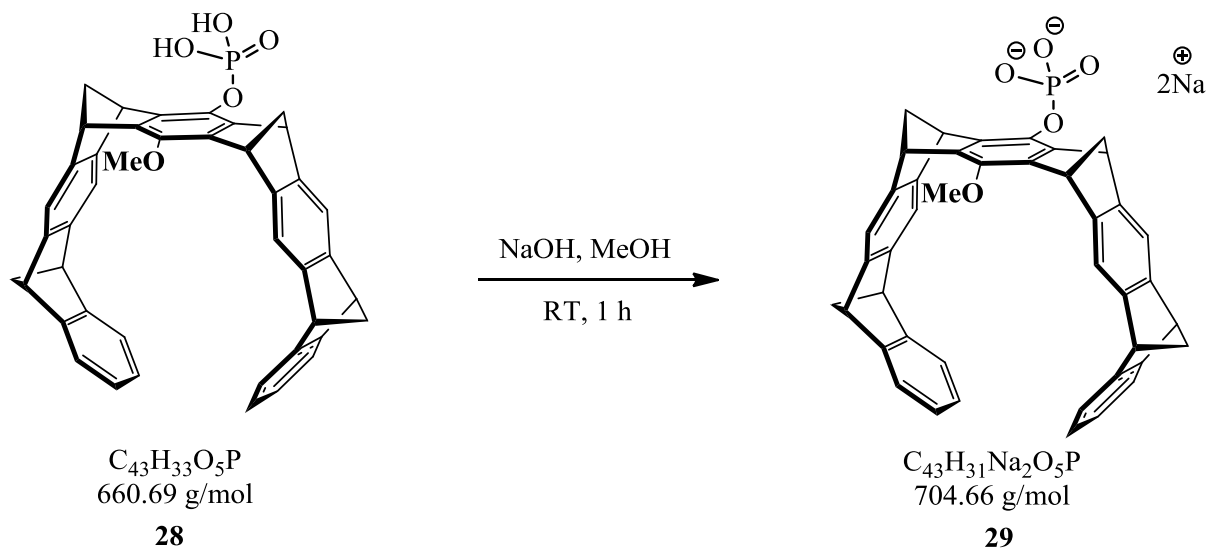
^{31}P -NMR (202 MHz, CDOD_3): δ [ppm] = -4.59.

HRMS: ESI+ (480 eV) m/z (%) = 683.2101 gef. 683.1958 ber. $[M+Na]^+$
 ESI- (480 eV) m/z (%) = 659.2103 gef. 659.1982 ber. $[M-H]^-$

IR (ATR) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: 2969 (C-H), 2934 (C-H), 1472 (C-H), 1277 (P=O), 1021 (C-O-C), 977 (C-O).

5.2.5.5 Darstellung von 19-Methoxy-8-dinatriumphosphat-

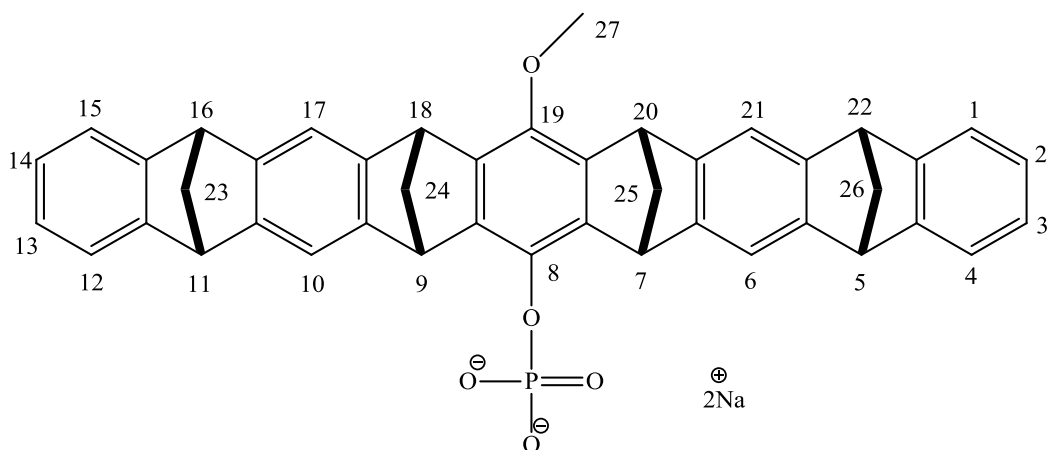
(5 α ,7 α ,9 α ,11 α ,16 α ,18 α ,20 α ,22 α)-5,7,9,11,16,18,20,22-octahydro-
5,22:7,20:9,18:11,16-tetramethanononacen (29)

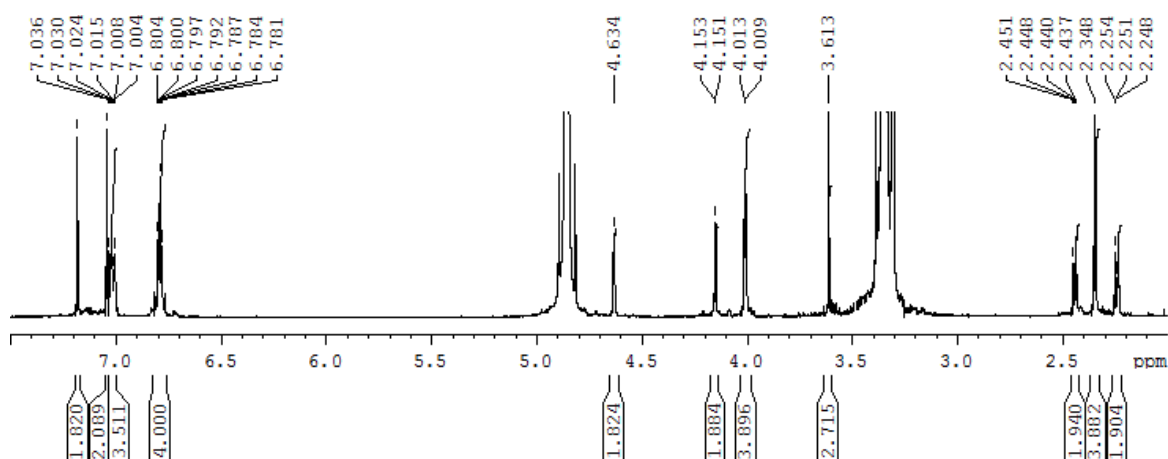
**Durchführung:**

Unter Schutzgas werden 86.00 mg (0.13 mmol) Hydrogenphosphatpinzette **28** in 20 mL Methanol abs. gelöst und mit 15.083 mg (0.26 mmol) Natriumhydroxid-Monohydrat versetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird bei vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand an der Ölpumpe für mehrere Stunden getrocknet.

Ausbeute: quantitativ

Schmelzpunkt: > 210 °C Zersetzung





$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDOD_3): δ [ppm] = 7.18 (s, 2H, 6-H, 10-H), 7.04 (s, 2H, 17-H, 21-H), 7.02 (m, 4H, 1-H, 4-H, 12-H, 15-H), 6.79 (m, 4H, 2-H, 3-H, 13-H, 14-H), 4.63 (s, 2H, 7-H, 9-H), 4.15 (s, 2H, 18-H, 20-H), 4.01 (s, 4H, 5-H, 11-H, 16-H, 20-H), 3.61 (s, 3H, 27-H), 2.44 (m, 2H, 24-H, 25-H), 2.35 (m, 4H, 23-H, 26-H), 2.24 (m, 2H, 24-H, 25-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDOD_3): δ [ppm] = 152.33 (4a-C, 11a-C), 152.24 (15a-C, 22a-C), 150.14 (5a-C, 10a-C), 149.66 (16a-C, 21a-C), 148.79 (6a-C, 9a-C), 148.71 (17a-C, 20a-C), 146.11 (19-C), 143.42 (18a-C, 19a-C), 143.40 (7a-C, 8a-C), 141.21 (8-C), 126.12 (3-C, 13-C), 125.99 (2-C, 14-C), 122.24 (4-C, 12-C), 122.12 (1-C, 15-C), 117.90 (6-C, 10-C), 116.38 (17-C, 21-C), 69.23 (24-C, 25-C), 69.19 (23-C, 26-C), 62.08 (27-C), 52.54 (5-C, 11-C, 16-C, 22-C), 52.52 (18-C, 20-C, 7-C, 9-C).

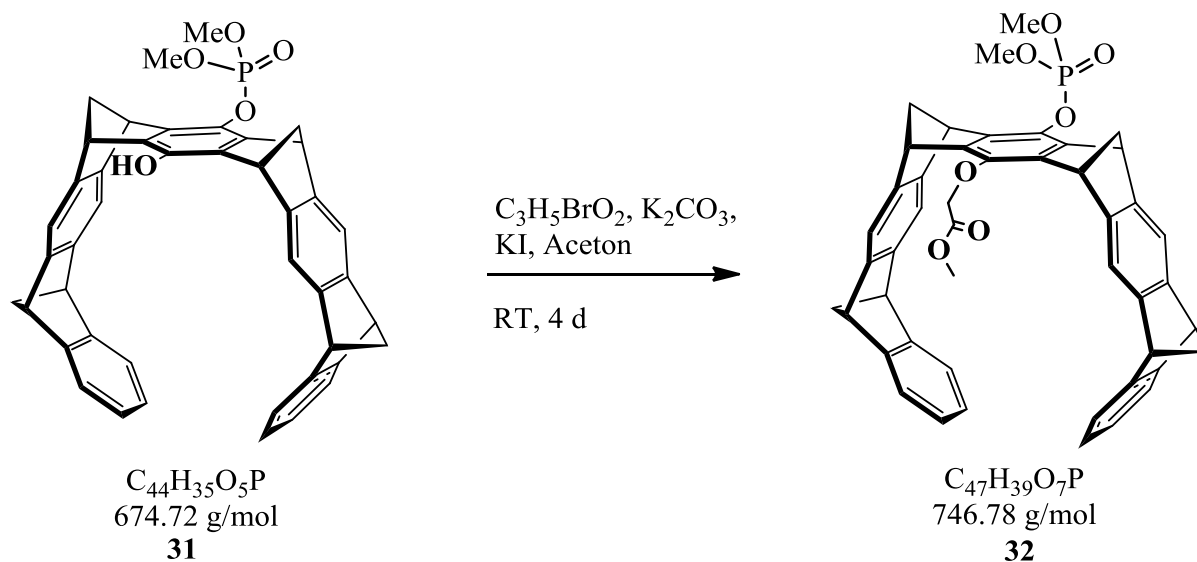
$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, CDOD_3): δ [ppm] = 0.27.

HRMS: ESI+ (480 eV) m/z (%) = 705.1782 gef. 705.1777 ber. $[\text{M}+\text{H}]^+$

ESI- (480 eV) m/z (%) = 659.1902 gef. 659.1982 ber. $[\text{M}-\text{H}]^-$

IR (ATR) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: 2971 (C-H), 2934 (C-H), 1474 (C-H), 1279 (P=O), 1092 (C-O-C), 976 (C-O).

**5.2.5.6 Darstellung von 8-Dimethylphosphat-19-(Methylcarboxy)methoxy-
(5 α ,7 α ,9 α ,11 α ,16 α ,18 α ,20 α ,22 α)-5,7,9,11,16,18,20,22-octahydro-
5,22:7,20:9,18:11,16-tetramethanononacen (32)**

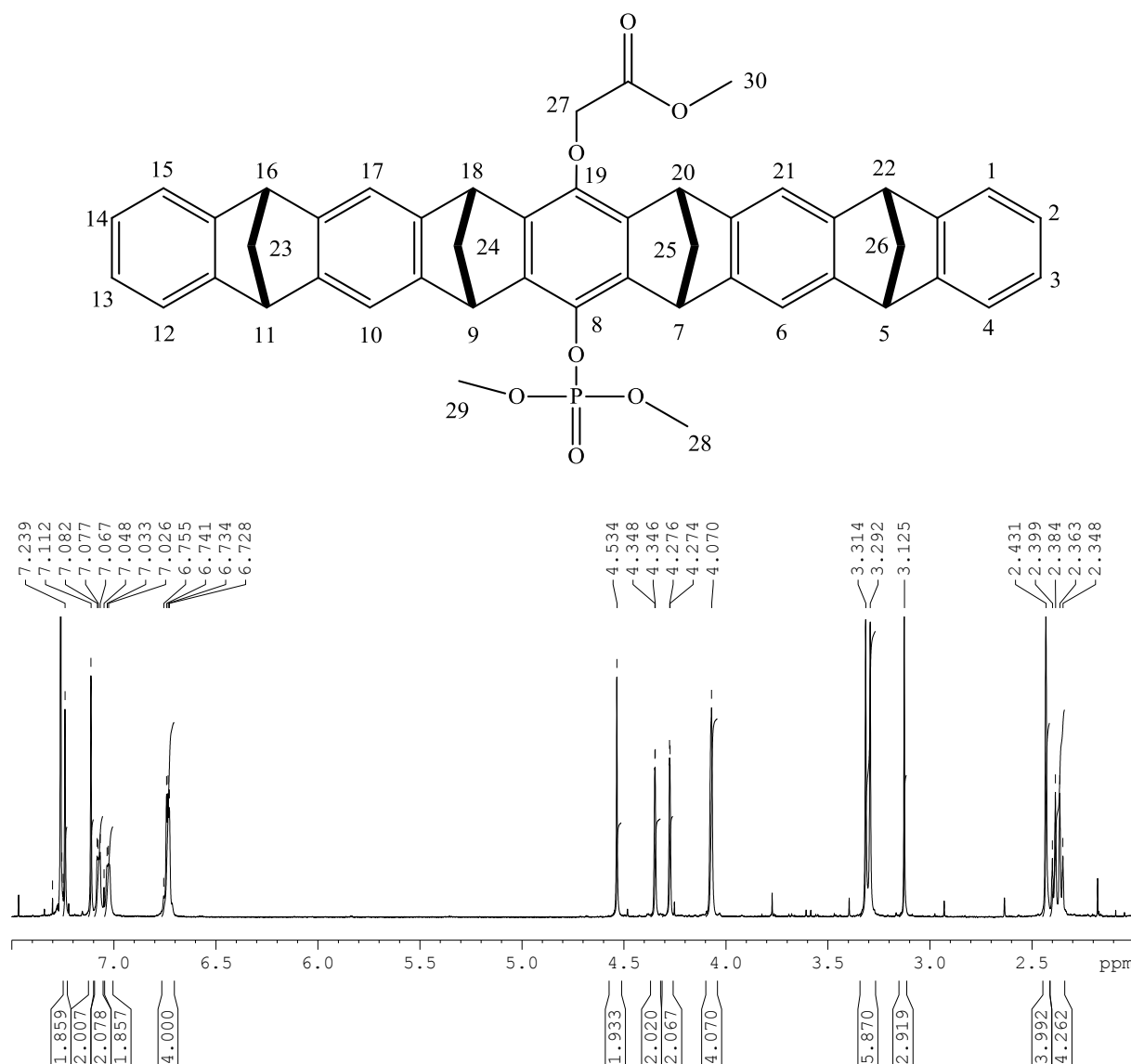


Durchführung:

33 mg (0.048 mmol) Monophosphatpinzette **31** werden unter Schutzgas in 20 mL Aceton abs. gelöst und mit 0.005 mL (0.053 mmol) Methylbromacetat, 7.46 mg (0.054 mmol) Kaliumcarbonat und Kaliumiodid versetzt. Die Reaktionsmischung wird für vier Tage unter Schutzgas bei Raumtemperatur gerührt. Zur weiteren Aufarbeitung wird zu der Reaktionsmischung 50 mL Dichlormethan gegeben und diese nacheinander mit ges. NH₄Cl-Lösung, ges. NaHCO₃-Lösung und H₂O gewaschen. Die org. Phase wird mit Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Das erhaltene Öl wird säulenchromatographisch (KG 60, CH/EE = 3:1) gereinigt.

Ausbeute: 17 mg (0.023 mmol, 48%)

Schmelzpunkt: > 240 °C Zersetzung



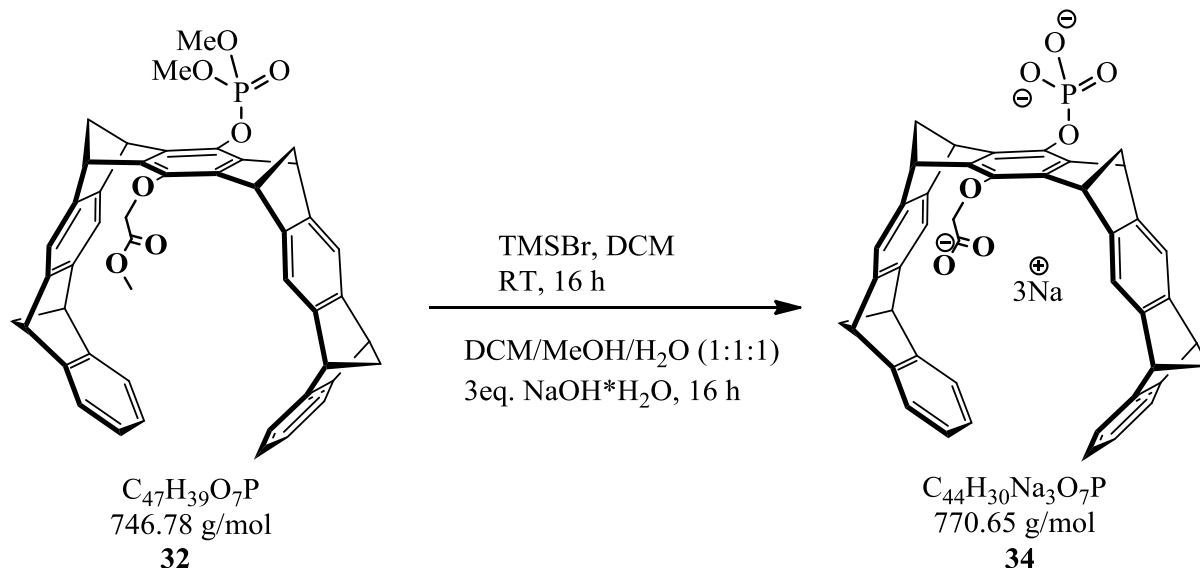
^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.24 (s, 2H, 6-H, 10-H), 7.14 (s, 2H, 17-H, 21-H), 7.08 (m, 2H, 4-H, 12-H), 7.03 (m, 2H, 1-H, 15-H), 6.74 (m, 4H, 2-H, 3-H, 13-H, 14-H), 4.53 (s, 2H, 7-H, 9-H), 4.34 (s, 2H, 27-H), 4.27 (s, 2H, 18-H, 20-H), 4.08 (s, 4H, 5-H, 11-H, 16-H, 22-H), 3.30 (d, 6H, $^3J_{28\text{-H/P}, 29\text{-H-P}} = 11.1$ Hz, 28-H, 29-H), 3.12 (s, 3H, 30-H), 2.43 (m, 4H, 24-H, 25-H), 2.37 (m, 4H, 23-H, 26-H).

^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 169.87 (27a-C), 150.60 (4a-C, 11a-C), 150.68 (15a-C, 22a-C), 147.78/147.76 (6a-C, 9a-C), 147.02 (5a-C, 10a-C), 146.77 (17a-C, 20a-C), 145.16 (16a-C, 21a-C), 141.32/141.30 (8-C), 140.71 (19-C), 135.23/135.17 (7a-C, 8a-C, 18a-C, 19a-C), 124.79 (3-C, 13-C), 124.69 (2-C, 14-C), 121.63 (4-C, 12-C), 121.12 (1-C, 15-C), 117.29 (6-C, 10-C), 116.28 (17-C, 21-C), 70.21 (27-C), 69.34 (23-C, 26-C), 68.64 (24-C, 25-C), 54.98 (29-C), 54.93 (28-C), 51.91 (18-C, 20-C), 51.32/51.30 (7-C, 9-C), 48.70 (5-C, 11-C), 48.46 (16-C, 22-C), 27.06 (30-C).

^{31}P -NMR (202 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = -3.63.

HRMS: ESI+ (480 eV) m/z (%) = 769.2321 gef. 769.2326 ber. $[\text{M}+\text{Na}]^+$

**5.2.5.7 Darstellung von Natrium-8-phosphat-19-methylcarboxy-
(5 α ,7 α ,9 α ,11 α ,16 α ,18 α ,20 α ,22 α)-5,7,9,11,16,18,20,22-octahydro-
5,22:7,20:9,18:11,16-tetramethanononacen (34)**

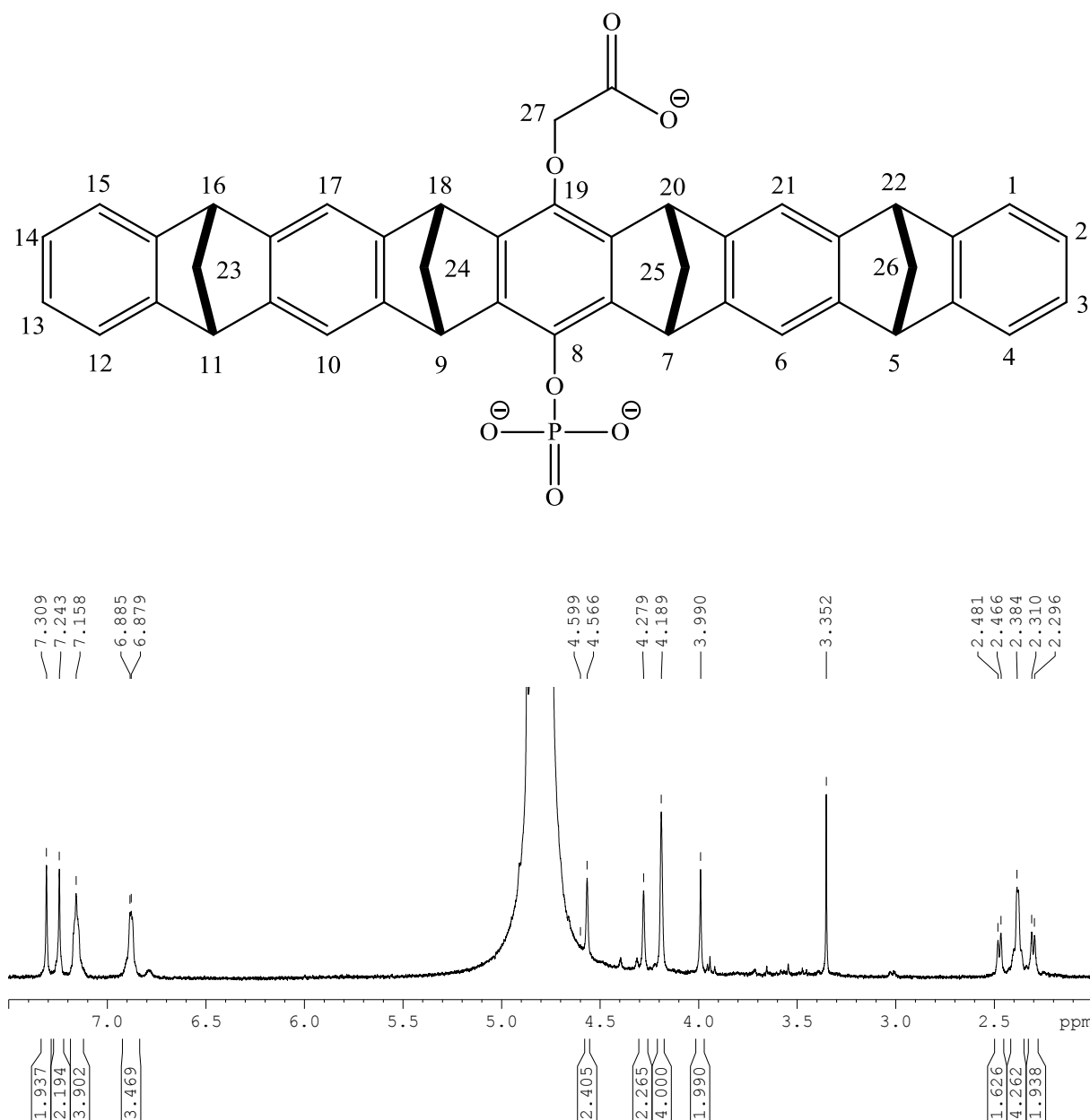


Durchführung:

16 mg (0.023 mmol) Phosphatmethoxycarbonylpinzette **32** werden unter Schutzgas in 10 mL Dichlormethan abs. gelöst und mit 23.4 μL (0.18 mmol) Trimethylsilylbromid versetzt. Die Reaktionslösung wird für sechs Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird abkondensiert und der Rückstand für drei Stunden im Ölpumpenvakuum getrocknet. Der Rückstand wird in 15 mL eines DCM/MeOH/H₂O-Gemisch (1:1:1) aufgenommen und mit 0.07 mL 1 M NaOH versetzt. Nach 16 Stunden Rühren werden die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wird vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand mit Acetonitril basenfrei gewaschen.

Ausbeute: quantitativ

Schmelzpunkt: > 200 °C Zersetzung



^1H -NMR (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 7.31 (s, 2H, 6-H, 10-H), 7.24 (s, 2H, 17-H, 21-H), 7.16 (m, 4H, 1-H, 4-H, 12-H, 15-H), 6.88 (m, 4H, 2-H, 3-H, 13-H, 14-H), 4.57 (s, 2H, 7-H, 9-H), 4.28 (s, 2H, 18-H, 20-H), 4.19 (s, 4H, 5-H, 11-H, 16-H, 22-H), 3.99 (s, 2H, 27-H), 2.47 (m, 2H, 24-H, 25-H), 2.38 (m, 4H, 23-H, 26-H), 2.30 (m, 2H, 24-H, 25-H).

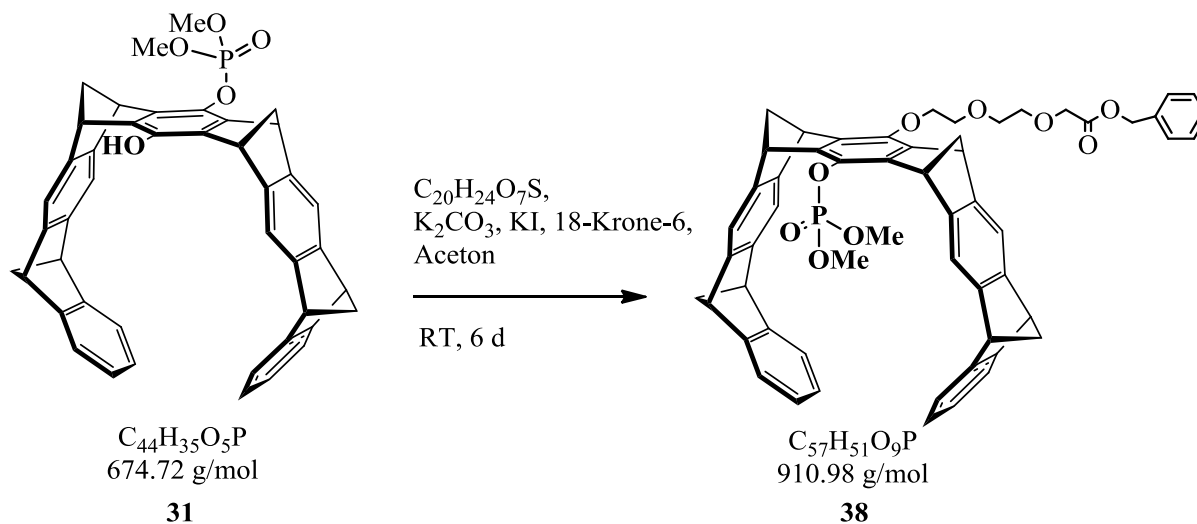
^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O): δ [ppm] = 168.22 (27a-C), 151.11 (4a-C, 11a-C, 15a-C, 22a-C), 148.15 (6a-C, 9a-C, 17a-C, 20a-C), 144.43 (5a-C, 10a-C, 16a-C, 21a-C), 142.57 (8-C), 140.28 (7a-C, 8a-C, 18a-C, 19a-C), 127.80 (19-C), 125.14 (2-C, 3-C, 13-C, 14-C), 121.33 (1-C, 4-C, 12-C, 15-C), 118.34 (6-C, 10-C), 116.64 (17-C, 21-C), 115.96 (27-C), 68.18 (23-C, 24-C, 25-C, 26-C), 50.77 (7-C, 9-C, 18-C, 20-C), 48.23 (5-C, 11-C, 16-C, 22-C).

^{31}P -NMR (202 MHz, D_2O): δ [ppm] = 0.93.

HRMS:	ESI+ (480 eV)	m/z (%) = 771.1499 gef.	771.1495 ber.	$[\text{M}+\text{H}]^+$
		m/z (%) = 793.1317 gef.	793.1314 ber.	$[\text{M}+\text{Na}]^+$
	ESI- (480 eV)	m/z (%) = 351.0816 gef.	351.0909 ber.	$[\text{M}-2\text{Na}+\text{H}]^-$

IR (ATR) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]: 2973 (C-H), 2840 (C-H), 1601 (C=O), 1424 (C-H), 1278 (P=O), 977 (C-O).

**5.2.5.8 Darstellung von 19-(Benzyl-3,6-dioxaoctanate)-8-dimethylphosphat-
(5a,7a,9a,11a,16a,18a,20a,22a)-5,7,9,11,16,18,20,22-octahydro-
5,22:7,20:9,18:11,16-tetramethanononacen (38)**

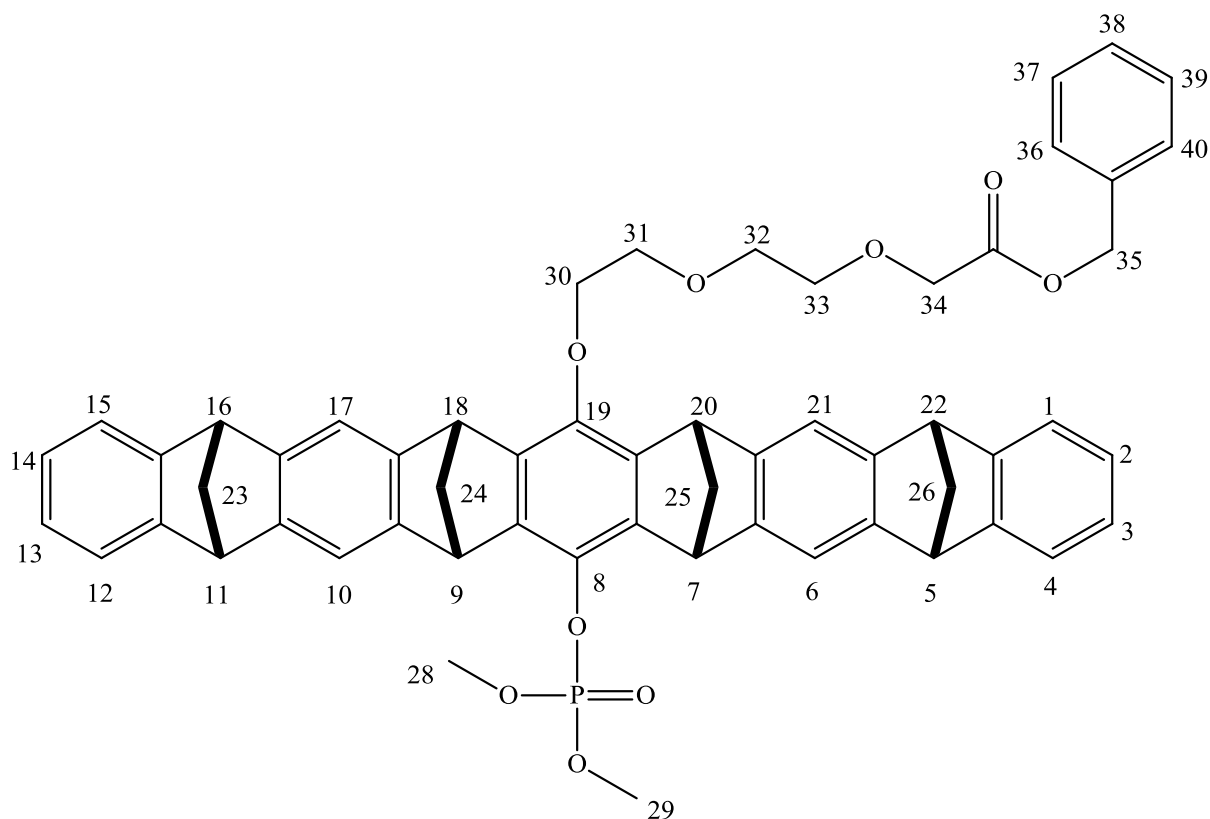


Durchführung:

Unter Schutzgas werden 29 mg (0.043 mmol) Monophosphatpinzette **31** in 20 mL Aceton abs. gelöst, mit 26.33 mg (0.065 mmol) Tosylglykollinker **37** versetzt und 9 mg (0.065 mmol) Kaliumcarbonat, sowie Kaliumiodid und 18-Krone-6-ether hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wird für sechs Tage bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird entfernt, der Rückstand mit 20 mL Chloroform aufgenommen und mit je 20 mL ges. $NaHCO_3$ -Lösung, H_2O und ges. $NaCl$ -Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über $MgSO_4$ getrocknet, vom Lösungsmittel befreit und säulenchromatographisch (KG 60, CH/EE = 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 8 mg (0.00878 mmol, 20%)

Das 1H -NMR-Spektrum zeigt eine Verunreinigung des Produktes mit dem Linker.



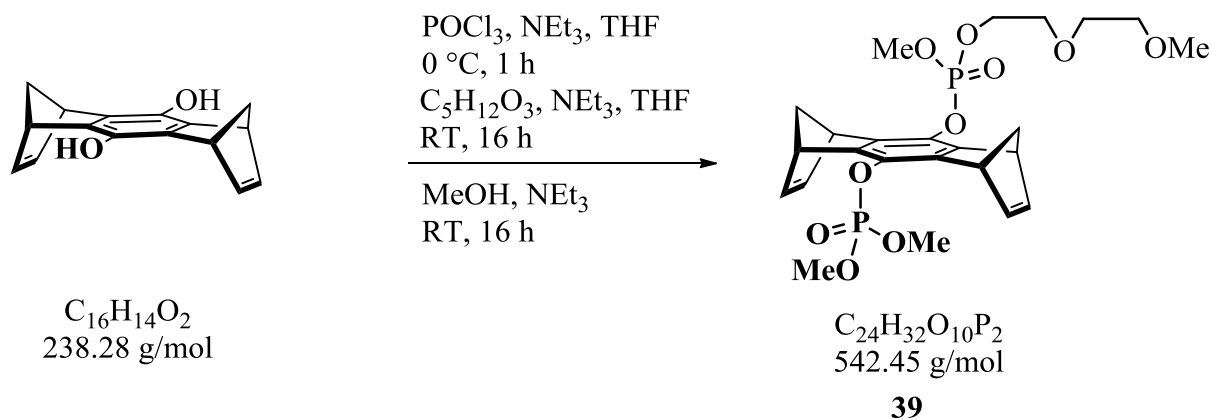
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.36 (s, 8H, 36-H, 37-H, 38-H, 39-H, 40-H), 7.22 (s, 2H, 6-H, 10-H), 7.14 (s, 2H, 17-H, 21-H), 7.04 (m, 4H, 1-H, 4-H, 12-H, 15-H), 6.73 (m, 4H, 2-H, 3-H, 13-H, 14-H), 5.19 (s, 2H, 35-H), 4.29 (m, 4H, 7-H, 9-H, 18-H, 20-H), 4.19 (m, 4H, 5-H, 11-H, 16-H, 22-H), 4.06 (m, 4H, 34-H), 3.70 (m, 14H, 30-H, 31-H, 32-H, 33-H), 3.41 (s, 3H, 28-H), 3.37 (s, 3H, 29-H), 2.36 (m, 8H, 23-H, 24-H, 25-H, 26-H).

$^{31}\text{P-NMR}$ (122 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = -3.35.

HRMS: ESI+ (480 eV) m/z = 933.3280 gef. m/z = 933.3163 ber. $[\text{M}+\text{Na}]^+$

5.2.6 Synthese von substituierten Phosphat-Modellverbindungen

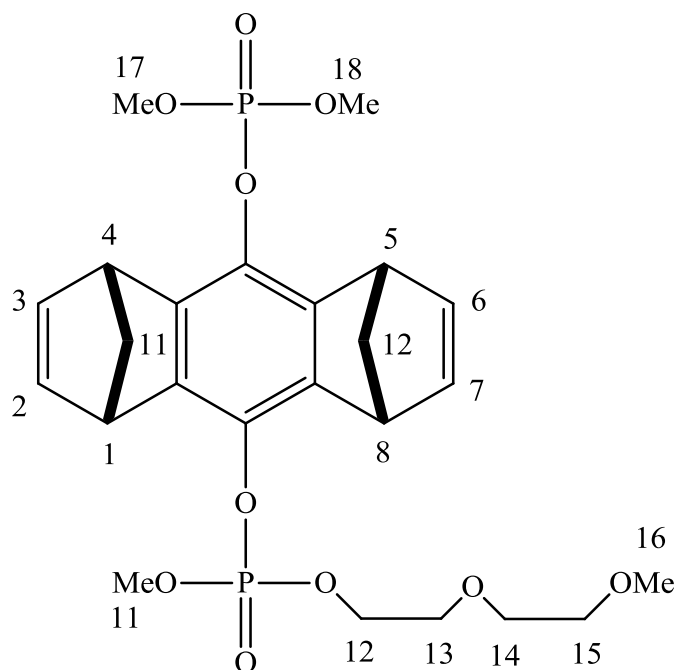
5.2.6.1 Darstellung von (1 α ,4 α ,5 α ,8 α)-1,4,5,8-Tetrahydro-1,4:5,8-dimethanoanthracen-(9-methyl(methoxydiethyl)-10-dimethyl)phosphat (39)



Durchführung:

100 mg (0.42 mmol) Hydroxyspacereinheit werden unter Schutzgas in 10 mL THF abs. gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit 0.54 mL (5.88 mmol) POCl₃ sowie mit 1 mL (7.21 mmol) NEt₃ versetzt. Die Reaktionsmischung wird für eine Stunde unter Schutzgas stark gerührt und dann auf Raumtemperatur erwärmt. Der entstandene Feststoff wird über eine Umkehrfritte unter Schutzgas abfiltriert und das überschüssige POCl₃ und das Lösungsmittel abkondensiert. Der Rückstand wird mit 10 mL THF abs. aufgenommen sowie 17.32 μL (0.147 mmol) Methoxyethoxyethanol und 1.43 mL NEt₃ zugegeben und für 16 Stunden unter Schutzgas bei Raumtemperatur gerührt. Zu der Lösung werden dann noch 5 mL Methanol abs. und wiederum 1.43 mL NEt₃ gegeben und abermals für 16 Stunden gerührt. Zur weiteren Aufarbeitung wird das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand mit Chloroform aufgenommen und einmal mit ges. NaHCO₃-Lösung sowie zweimal mit H₂O extrahiert. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, eingeeengt und der Rückstand säulenchromatographisch (KG 60, Chloroform/Aceton = 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 20 mg (0.0369 mmol, 9%)

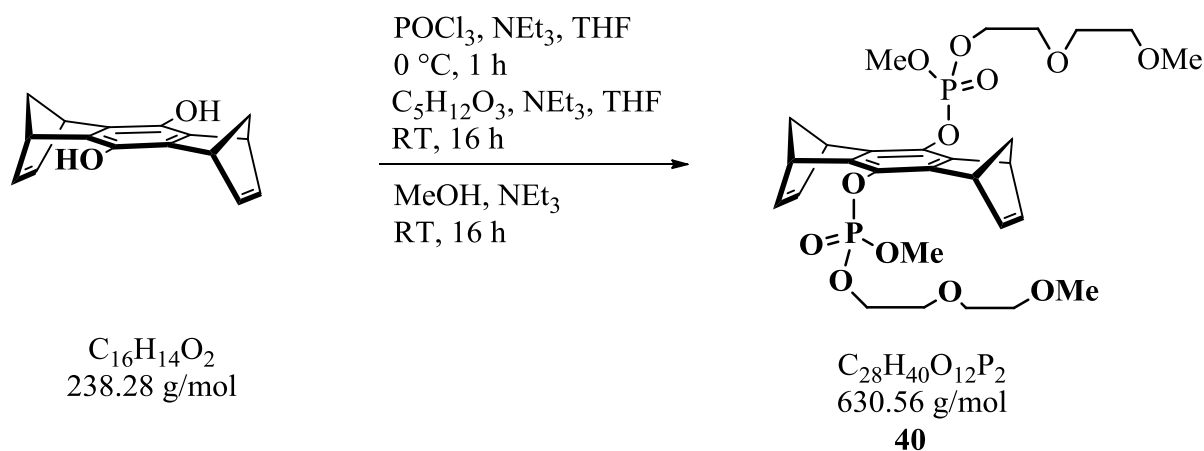


¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 6.77 (m, 4H, 2-H, 3-H, 6-H, 7-H), 4.26 (m, 2H, 12-H), 4.12 (m, 4H, 1-H, 4-H, 5-H, 8-H), 3.83 (m, 9H, 11-H, 17-H, 18-H), 3.73 (m, 2H, 13-H), 3.64 (m, 2H, 14-H), 3.54 (m, 2H, 15-H), 3.37 (s, 3H, 16-H), 2.22 (m, 4H, 9-H, 10-H).

³¹P-NMR (122 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = -3.13, -4.19.

HRMS:	ESI+ (480 eV)	m/z (%) = 543.1595 gef.	543.1543 ber.	[M+H] ⁺
		m/z (%) = 565.1418 gef.	565.1363 ber.	[M+Na] ⁺

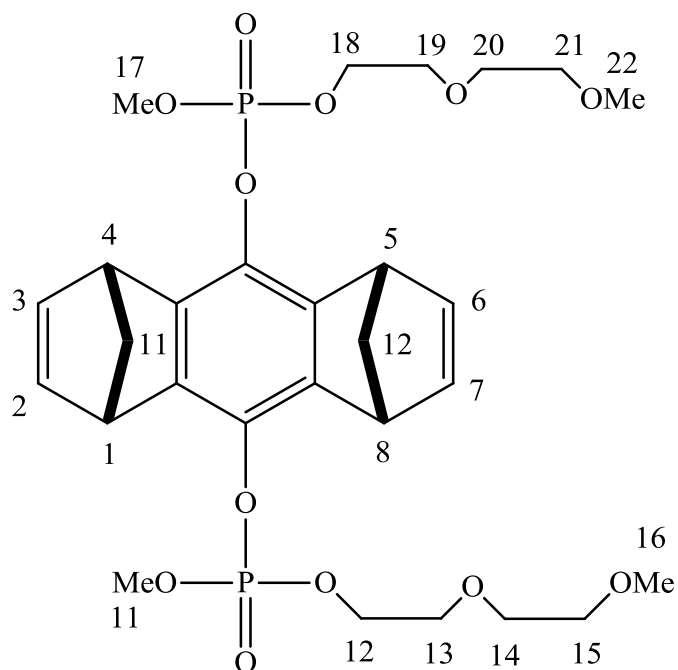
5.2.6.2 Darstellung von (1 α ,4 α ,5 α ,8 α)-1,4,5,8-Tetrahydro-1,4:5,8-dimethanoanthracen-9,10-bis(methyl(methoxydiethyl)phosphat) (40)



Durchführung:

Unter Schutzgas werden 100 mg (0.42 mmol) Hydroxyspacereinheit in 10 mL THF abs. gelöst, auf $0\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt und mit 0.54 mL (5.88 mmol) POCl_3 , sowie 1 mL (7.21 mmol) NEt_3 versetzt. Die Reaktionsmischung wird für eine Stunde unter Schutzgas stark gerührt und dann auf Raumtemperatur erwärmt. Der entstandene Feststoff wird über eine Umkehrfritte unter Schutzgas abfiltriert und das überschüssige POCl_3 und das Lösungsmittel abkondensiert. Der Rückstand wird mit 10 mL THF abs. aufgenommen, sowie $34.7\text{ }\mu\text{L}$ (0.292 mmol) Methoxyethoxyethanol und 1.43 mL NEt_3 zugegeben und für 16 Stunden unter Schutzgas bei Raumtemperatur gerührt. Zu der Lösung werden dann noch 5 mL Methanol abs. und wiederum 1.43 mL NEt_3 gegeben und abermals für 16 Stunden gerührt. Zur weiteren Aufarbeitung wird das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand mit Chloroform aufgenommen und einmal mit ges. NaHCO_3 -Lösung sowie zweimal mit Wasser extrahiert. Die organische Phase wird über MgSO_4 getrocknet, eingeeengt und der Rückstand säulenchromatographisch (KG 60, Chloroform/Aceton = 2:1) gereinigt.

Ausbeute: 42 mg (0.067 mmol, 16%)



$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 6.79 (m, 4H, 2-H, 3-H; 6-H, 7-H), 4.26 (m, 4H, 12-H, 18-H), 4.13 (m, 4H, 1-H, 4-H, 5-H, 8-H), 3.84 (m, 6H, 11-H, 17-H), 3.73 (m, 4H, 13-H, 19-H), 3.64 (m, 4H, 14-H, 20-H), 3.54 (m, 4H, 15-H, 21-H), 3.37 (s, 6H, 16-H, 22-H), 2.21 (m, 4H, 11-H, 12-H).

$^{31}\text{P-NMR}$ (122 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = -4.10, -4.19.

HRMS:	ESI+ (480 eV)	m/z (%) = 631.2142 gef.	631.2068 ber.	$[\text{M}+\text{H}]^+$
		m/z (%) = 653.1965 gef.	653.1887 ber.	$[\text{M}+\text{Na}]^+$

5.3 Untersuchungen an Enzymen

5.3.1 Generierung der DNA-Doppelstränge

Für die Generierung der DNA-Doppelstränge (aktiv, sowie intakt) werden die DNA-Einzelstränge in 10 mM Trispuffer gelöst, so dass sich für die Einzelstränge die gleiche Konzentration ergibt. Von den Einzelstrang-Lösungen wird der gleiche Volumenanteil entnommen und miteinander vereinigt. Die DNA-Lösungen werden in einem Thermomixer bei 90 °C fünf Minuten behandelt und ganz langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

DNA-Doppelstrang mit Einzelstrangbruch:

Tabelle 5.3.1: Zusammensetzung der DNA 1.

Oligo	M [Da]	n [nmol]	c [nmol/ μ L]	V _{Tris} [μ L]
20 BP-Einzelstr.	6077	482.3	5	96.46
10 BP-Einzelstr.	3093	387.0	10	38.7
10 BP-Einzelstr.	3002	402.3	10	40.23

→ je 35 μ L der 10 BP-Einzelstränge mit 70 μ L des 20 BP-Einzelstrangs vereinen. Es ergibt eine Endkonzentration von $c = 2.5$ nmol/ μ L (30.43 μ g/ μ L)

Intakter DNA-Doppelstrang:

Tabelle 5.3.2: Zusammensetzung der DNA 2.

Oligo	M [Da]	n [nmol]	c [nmol/ μ L]	V _{Tris} [μ L]
20 BP-Einzelstr.	6077	117.5	2	58.75
20 BP-Einzelstr.	6157	132.8	2	66.4

→ je 50 μ L der 20 BP-Einzelstränge vereinen. Es ergibt eine Endkonzentration von $c = 1.0$ nmol/ μ L (12.234 μ g/ μ L)

5.3.2 DNA-Schmelzkurven

Um die Generierung der DNA-Doppelstränge zu kontrollieren, werden DNA-Schmelzkurven von den beiden verwendeten DNA-Doppelsträngen aufgenommen. Zur Aufnahme der Schmelzkurven werden die DNA-Stammlösung mit dem verwendeten Tris-Puffer auf eine optischen Dichte von 0.5 verdünnt, wobei 1 OD = 50 µg/mL entspricht.

Für den aktiven DNA-Doppelstrang mit Einzelstrangbruch wurde eine Schmelztemperatur von 44 °C ermittelt.

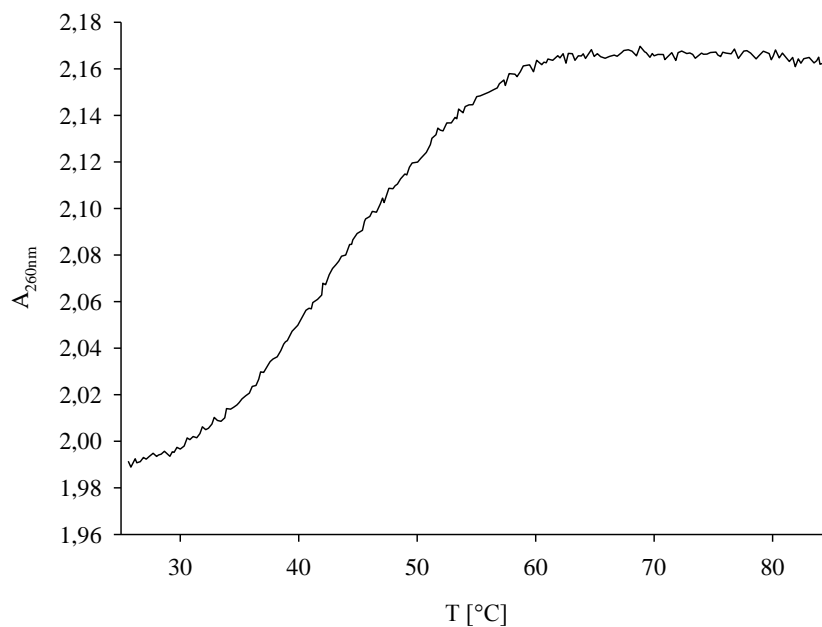


Abbildung 5.3.2.1: DNA-Schmelzkurve der aktiven DNA 1 mit Einzelstrangbruch.

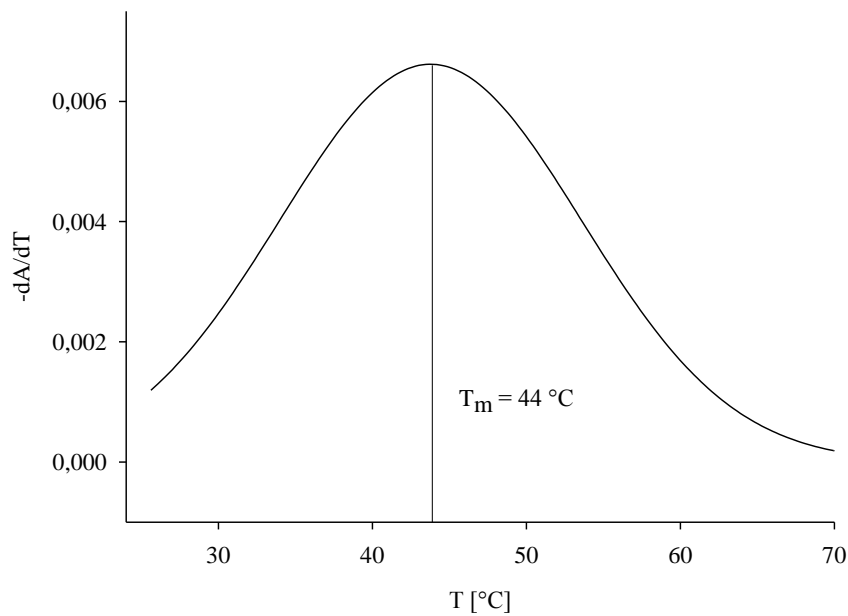


Abbildung 5.3.2.2: 1. Ableitung der Schmelzkurve der DNA 1 zur genauen Ermittlung der Schmelztemperatur.

Für den intakten DNA-Doppelstrang ohne Strangbruch wurde hingegen eine Schmelztemperatur von 66 °C ermittelt. Die Schmelztemperatur liegt bei der DNA 2 höher, da der Doppelstrang eine durchgehende Phosphatrückwand aufweist. Die durchgehende Phosphordiesterbindung kann durch Wasserstoffbrückenbindungen eine zusätzliche Stabilität liefern, die die Schmelztemperatur erhöht.

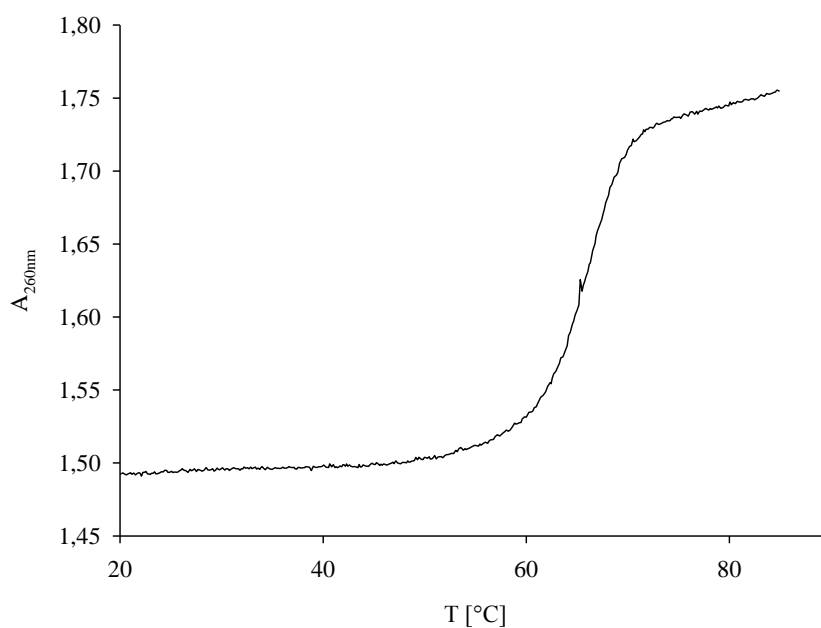


Abbildung 5.3.2.3: Schmelzkurve des intakten DNA-Doppelstranges DNA 2.

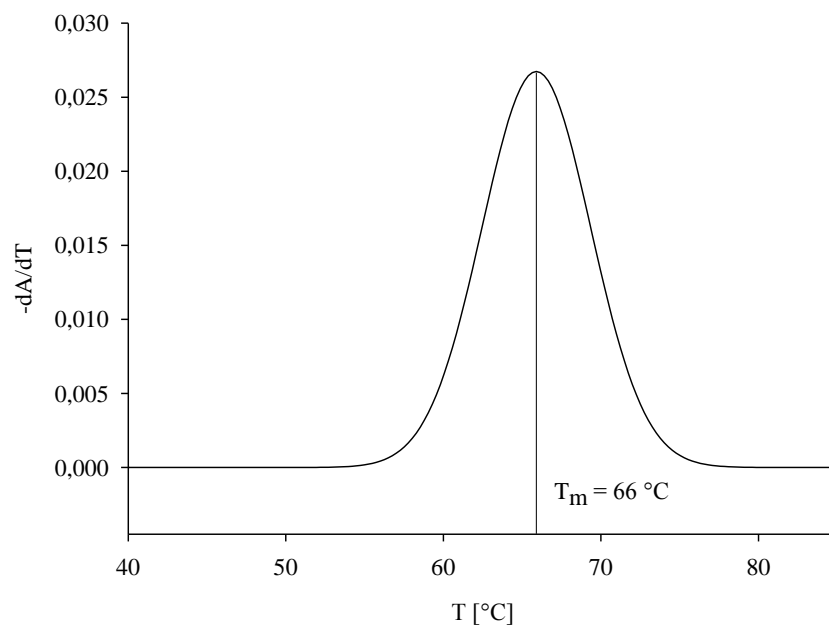


Abbildung 5.3.2.4: 1. Ableitung der DNA-Schmelzkurve der intakten DNA 2.

5.3.3 Untersuchung der Inhibition von PARP-1 mittels Electrophoretic Mobility Shift Assay

Für die Untersuchung der Inhibition von PARP-1 durch die Biphosphatpinzette **22** musste zunächst ein nicht denaturierendes Polyacrylamid-Gel (7.5%) gegossen werden. Die Zusammensetzung des Gels (Bestandteile für zwei Gele) ist im Folgenden angegeben.

Tabelle 5.3.3.1: Zusammensetzung des 7.5%igen nicht denaturierenden Polyacrylamid-Gels.

10x TBE Puffer	3.00 mL
30% Acrylamid (29:1)	6.25 mL
dH ₂ O	20.75 mL
<hr/>	
Tetramethyldiamin (TEMED)	17 µL
Ammoniumpersulfat (APS)	125 µL

APS startet die Polymerisation des Gels, so dass nach der Zugabe dessen unmittelbar das Gel in eine 18er Kammer gegossen wird. Das Gel ist nach einer halben Stunde fest und wird im Laufpuffer (1x TBE Puffer) 30 Minuten bei 30 V unbeladen laufen gelassen. Während des Preruns können die Proben wie folgt vorbereitet werden.

Gel 1:

Tabelle 5.3.3.2: Beladung Gel 1.

	1	2	3	4
	DNA	PARP	DNA+PARP	DNA+PARP+(22)
DNA	0.32 µL (400 nM)		0.32 µL (400 nM)	0.32 µL (400 nM)
PARP		4.35 µL (400 nM)	4.35 µL (400 nM)	4.35 µL (400 nM)
10x PARP Puffer	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
H ₂ O	8.68 µL	4.33 µL	4.65 µL	3.89 µL
22				0.44 µL (100 µM)

Gel 2:

Tabelle 5.3.3.3: Beladung Gel 2.

	5	6	7	8	9	10
	DNA+(22)	PARP+(22)	Intakte DNA	Intakte DNA+PARP	Dialysiertes PARP+DNA	Dialysiertes PARP+(22)
DNA	0.32 µL (400 nM)		0.32 µL (400 nM)	0.32 µL (400 nM)	0.32 µL (400 nM)	
PARP		4.35 µL (400 nM)		4.35 µL (400 nM)	6.1 µL (400 nM)	6.1 µL (400 nM)
10x PARP Puffer	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
H ₂ O	8.24 µL	4.21 µL	8.68 µL	4.33 µL	2.58 µL	2.46 µL
22	0.44 µL (100 µM)	0.44 µL (100 µM)				0.44 µL (100 µM)

Die Proben müssen 45 Minuten inkubiert werden und können dann auf die Gele beladen werden. Die Gele werden für eine Stunde bei 30 V gefahren. Die Färbung der Gele erfolgte mit den Produkten SYBR[®] Green und SYPRO[®] Ruby von *Molecular Probes* nach den üblichen Angaben.^[150]

5.3.4 Lineweaver-Burk Plots von PARP-1 mit variabler Pinzetten-Konzentration

Für den Putt und Hergenrother Assay wurde eine 96-wells Platte aus Polypropylen genutzt, da diese hitzebeständig bei 110 °C ist. Es wurden bei verschiedenen Substratkonzentrationen verschiedene Inhibitorkonzentrationen eingesetzt und die Kinetik vermessen. Es erfolgte jeweils eine Dreifachbestimmung. Die genaue Beladung der Platte ist in Tabelle 5.3.4.1 dargestellt.

Tabelle 5.3.4.1: Beladung der 96-wells Platte. Konzentrationen sind in μM angegeben. Farblich markiert wurden die Pinzettenkonzentrationen, bei den darunter stehenden Konzentrationen handelt es sich um NAD^+ .

Neg.	Pos.	5	10	20	50	50	20	10	5	Pos.	Neg.
0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Neg.	Pos.	5	10	20	50	50	20	10	5	Pos.	Neg.
0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075
Neg.	Pos.	5	10	20	50	50	20	10	5	Pos.	Neg.
0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Neg.	Pos.	5	10	20	50	50	20	10	5	Pos.	Neg.
0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Neg.	Pos.	5	10	20	50	50	20	10	5	Pos.	Neg.
0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Neg.	Pos.	5	10	20	50	50	20	10	5	Pos.	Neg.
0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Neg.	Pos.	5	10	20	50	50	20	10	5	Pos.	Neg.
0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Neg.	Pos.	5	10	20	50	-	-	-	-	-	-
0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10						

Die Platte wird nacheinander mit 20 μL der jeweiligen NAD^+ -Konzentration, 10 μL der jeweiligen Pinzettenkonzentration, 10 μL DNA und 10 μL PARP-1 beladen. Die Negativkontrolle setzt sich zusammen aus 20 μL NAD^+ und 30 μL PARP-1 Puffer. Die Aktivitätskontrolle beinhaltet statt des Inhibitors 10 μL Puffer. Der Assay startet mit der Zugabe des Enzyms und wird danach noch 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgt die Zugabe von 20 μL einer 2 M wässrigen KOH-Lösung und 20 μL einer 20%igen Acetophenon-Lösung (in Ethanol). Nach zehnminütiger Inkubation bei 4 °C wird

90 μL Ameisensäure (88%ig) zugegeben und für 5 Minuten bei 110 °C stengelassen. Nach Erkalten auf Raumtemperatur wird die Platte im Fluoreszenzgerät vermessen (Anregung 360 nm, Emission 445 nm).

Die Negativkontrollen werden benötigt, um die Fluoreszenzänderung ΔFI zu ermitteln. Wie bereits in der vorherigen Arbeit von *Talbiersky* bestätigt, unterliegt der Assay einer linearen Kinetik, so dass die Assay-Vorschrift mit einer 15 minütigen Inkubationszeit verwendet werden darf.^[56] Zur Auswertung der ermittelten Werte müssen nun die Negativkontrollen verwendet werden. Diese Negativkontrollen stellen die FI-Werte der anfänglichen NAD^+ -Konzentration ($t = 0$ s) dar. Die Differenz zwischen den FI-Werten der Negativkontrollen und den FI-Werten der Aktivitätskontrollen (natives, reines Enzym), bzw. der FI-Werte bei Pinzettengabe (Inhibition des Enzyms) ergibt ΔFI (nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten, bzw. 900 s).

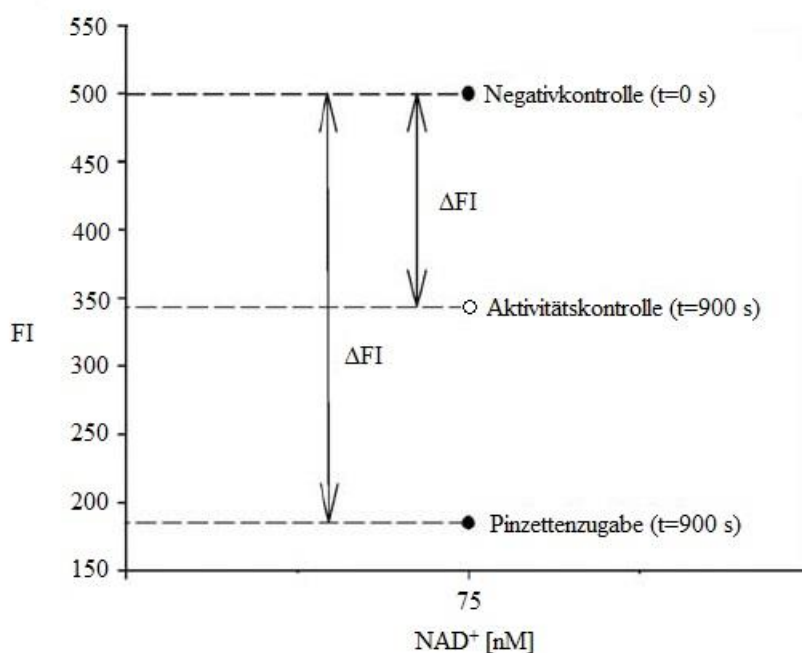


Abbildung 5.3.4.1: Bestimmung von ΔFI für die Lineweaver-Burk Plots.

Durch diese Differenz lässt sich die Geschwindigkeit v bestimmen. Die Geschwindigkeit setzt sich zusammen aus der Division von ΔFI durch die Zeit (900 s). Die Lineweaver-Burk Plots sind die reziproke Auftragung der Geschwindigkeit ($1/v$) gegen die NAD^+ -Konzentration ($1/[\text{NAD}^+]$).

Bei der Aufnahme der Lineweaver-Burk Plots mit Variation an DNA-Konzentration wurden die Konzentrationen von PARP-1 (2 $\mu\text{g/mL}$ pro Kavität) und NAD^+ (100 nM) konstant gehalten und die Fluoreszenzänderung bei den Konzentrationen von 5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ und 20 $\mu\text{g/mL}$ pro Kavität DNA mit den Inhibitorkonzentrationen von 0 μM , 10 μM und 50 μM gemessen.

5.3.5 Untersuchung der Hemmung von G6PD mittels CD-Spektroskopie

Für die CD-Spektren wurden folgende Konzentrationen gewählt. Die Substanzen waren alle gelöst im 20 mM Tris-Puffer ($pH = 7.52$).

Tabelle 5.3.5.1: Eingesetzte Konzentrationen bei der Messung 1.

$c(\text{G6PD})$	$1.5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$
$c(\text{Guanidiniumchlorid})$	0.138 M
$c(\mathbf{22})$	$5.88 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
$c(\text{Ac-Lys-OMe})$	$0.488 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

Es wurde zunächst die reine native G6PD vermessen, die danach durch Temperaturerhöhung auf Hitze-Denaturierung untersucht wurde. Da die CD-Spektren nur mit einer Akkumulation gemessen wurden und das CD-Spektrum zunächst nicht richtig den reversiblen Prozess durch die Zugabe des Lysinderivats zeigte, wurde die CD-Messung mit der Untersuchung der Phosphatpinzette mit einer Akkumulation von drei und höherer Lysinkonzentration wiederholt.

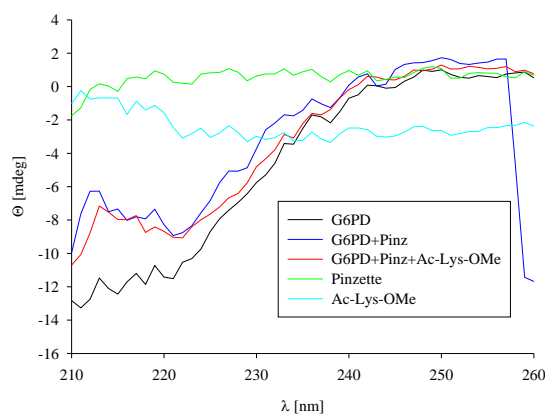


Abbildung 5.3.5.1: CD-Spektrum mit geringerer Lysinzugabe.

Für die neue Messung wurden folgende Konzentrationen gewählt.

Tabelle 5.3.5.2: Eingesetzte Konzentrationen bei der Messung 2.

$c(\text{G6PD})$	$1.93 \cdot 10^{-7} \text{ M}$
$c(\mathbf{22})$	$6.00 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
$c(\text{Ac-Lys-OMe})$	$9.98 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
$c(\text{Ac-Lys-OMe})$	$2.22 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

5.4 Bestimmung der Assoziationskonstanten K_a

5.4.1 Bestimmung der Assoziationskonstanten K_a mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektroskopie

Zur Bestimmung der Assoziationskonstanten (K_a) und der maximalen komplexinduzierten chemischen Verschiebung ($\Delta\delta_{\max}$) haben sich zwei Methoden bewährt. Einerseits kann eine ^1H -NMR Titration mit konstanter Substratkonzentration durchgeführt werden, die verlässliche Werte für Komplexe mit einer Assoziationskonstante von $\leq 10^4 \text{ M}^{-1}$ liefert. Für diese Methode wird eine definierte Menge an Rezeptor (m_R) in ein NMR-Röhrchen eingewogen und mit einem definierten Volumen an Substratlösung ($[S]_0$) gelöst. Es muss darauf geachtet werden, dass die Konzentration der Substratlösung zu Beginn der Titration in 2-3 molaren Überschuss zur Rezeptorkonzentration vorliegt. Durch die Zugabe von definierten Volumina an Substratlösung wird die Rezeptorkonzentration verringert. Nach jeder Zugabe wird ein ^1H -NMR Spektrum aufgenommen und die chemische Verschiebung der Substratprotonen protokolliert.

Bei der Bestimmung der Dimerisierungskonstanten (K_{dim}) eines Rezeptors wird eine Verdünnungstitration aufgenommen. Dazu wird zunächst eine Stammlösung einer definierten Menge Rezeptors (m_R) in dem deuterierten Lösungsmittel gelöst und eine Verdünnungsreihe hergestellt. Dabei dient die Konzentration der Stammlösung als Startkonzentration und durch die Verdünnung mit dem verwendeten deuterierten Lösungsmittel werden fünf weitere Konzentrationen hergestellt, die sich jeweils um den Faktor 2 verringern.

Die Auswertung beider Methoden erfolgt durch die komplexinduzierte Hochfeldverschiebung ($\Delta\delta_{\text{obs}}$) der Substratprotonen und der Rezeptorkonzentration ($[R]_0$) mit Hilfe des Programm *TableCurve2D*^[151] nach der Gleichung (2) für die Assoziationskonstanten (K_a) und die maximale komplexinduzierte Hochfeldverschiebung ($\Delta\delta_{\max}$) der Substratkonzentrationen, bzw. mit der Gleichung (3) für die Dimerisierungskonstanten (K_{dim}), bzw. Selbstassoziationskonstanten.

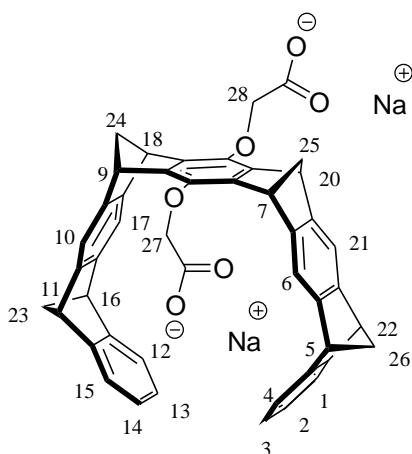
5.4.1.1 Selbstassoziationskonstante der Carboxymethylpinzette

Für die Bestimmung der Selbstassoziationskonstanten wurde eine ^1H -NMR-Titration aufgenommen. Die durch die Eigenassoziation induzierte chemische Verschiebung

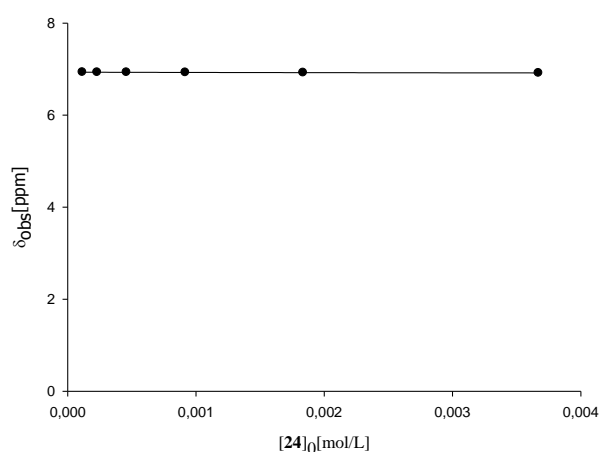
$\Delta\delta_{\max}$ [ppm] wird gemessen und die Position des reinen Monomers $\delta_{\text{monomer-calc}}$ [ppm] wird mit Hilfe des Programms *TableCurve 2D*^[151] und *SigmaPlot 10.0*^[152] berechnet, bzw. grafisch ermittelt.

Rezeptor	(24)	M_R [g/mol]	726.72
Lösungsmittel	D ₂ O	m_R [mg]	8.00
T [°C]	25	V_0 [ml]	3.0
Substrat	(24)	$[R]_0$ [mM]	3.669

$$\delta_0(2\text{-H}) [\text{ppm}] = 6.934$$



$[R]$ [mM]	δ_{obs} [ppm]	$\delta_{\text{monomer-calc}} - \delta_{\text{obs}} = \Delta\delta_{\text{calc}}$ [ppm]
3.669	6.918	0.016
1.835	6.925	0.009
0.917	6.929	0.005
0.459	6.931	0.003
0.229	6.932	0.002
0.115	6.934	0.000



$$K_{\text{dim}}[M^{-1}] = 39 \pm 60\%$$

$$\Delta\delta_{\max}(2\text{-H}, 3\text{-H}, 13\text{-H}, 14\text{-H}) [\text{ppm}] = 0.0219$$

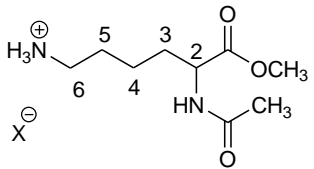
$$\Delta\delta_{\max}(1\text{-H}, 4\text{-H}, 12\text{-H}, 15\text{-H}) [\text{ppm}] = 0.0246$$

$$\Delta\delta_{\max}(6\text{-H}, 10\text{-H}, 17\text{-H}, 21\text{-H}) [\text{ppm}] = 0.0053$$

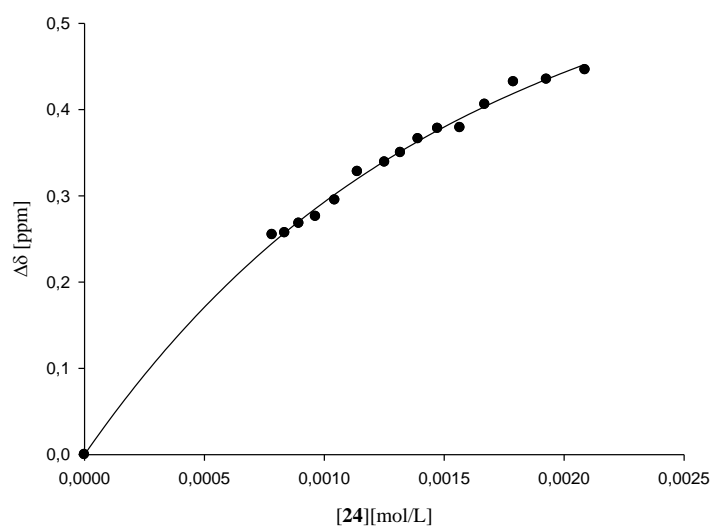
5.4.1.2 Bestimmung der Assoziationskonstanten der Carboxymethylpinzette und Carboxymethylphosphatpinzette mit verschiedenen Substraten

Mittels ^1H -NMR Spektroskopie wurden die Assoziationskonstanten der Carboxymethylpinzette und der Carboxymethylphosphatpinzette mit dem Lysinderivat Ac-Lys-OMe und dem Argininderivat Ac-Arg-OMe untersucht.

Untersuchung der Carboxymethylpinzette 24 mit Ac-Lys-OMe

Rezeptor	(24)	M_R [g/mol]	726.72
Lösungsmittel	Phosphatpuffer (74 mM)	M_S [g/mol]	238.7
T [°C]	25	m_R [mg]	0.910
Substrat	AcLysOMe	m_S [mg]	0.552
	δ_0 (3b-H) [ppm] = 1.682	V_0 [ml]	3.00
	δ_0 (6-H) [ppm] = 2.984	$[S_0]$ [mM]	0.771
	δ_0 (-Nac) [ppm] = 2.038		
	δ_0 (-CO ₂ Me) [ppm] = 3.763		
X^- : HPO_4^{2-}			

V [ml]	$[R]$ [mM]	δ (3b-H) [ppm]	$\Delta\delta_{\text{obs}}$ [ppm]	$\Delta\delta_{\text{calc}}$ [ppm]
0.60	2.0870	1.2360	0.4460	0.4524
0.65	1.9265	1.2470	0.4350	0.4351
0.70	1.7889	1.2500	0.4320	0.4188
0.75	1.6696	1.2760	0.4060	0.4036
0.80	1.5653	1.3030	0.3790	0.3893
0.85	1.4732	1.3040	0.3780	0.3759
0.90	1.3913	1.3160	0.3660	0.3634
0.95	1.3181	1.3320	0.3500	0.3515
1.00	1.2522	1.3430	0.3390	0.3404
1.10	1.1384	1.3540	0.3280	0.3199
1.20	1.0435	1.3870	0.2950	0.3016
1.30	0.9632	1.4060	0.2760	0.2853
1.40	0.8944	1.4140	0.2680	0.2705
1.50	0.8348	1.4250	0.2570	0.2571
1.60	0.7826	1.4270	0.2550	0.2449
0.00	0.0000	1.6820	0.0000	0.0000

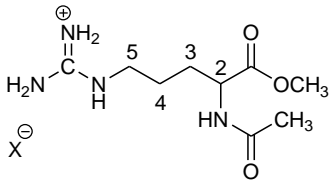


$$K_a[M^{-1}] = 859 \pm 11 \%$$

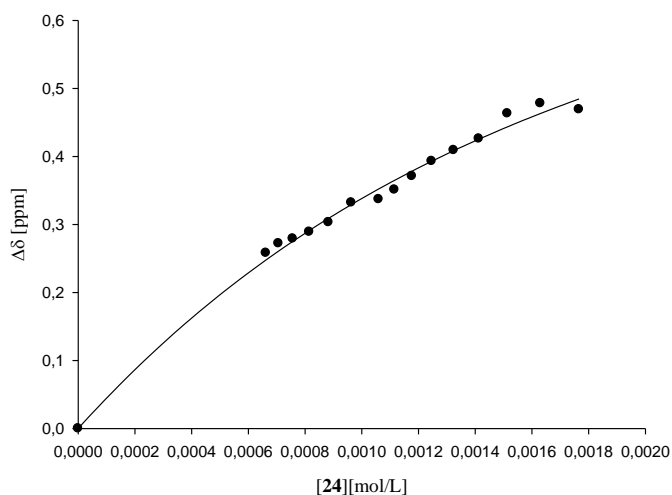
$$\Delta\delta_{\max}(3b-H) = 0.7744$$

$$\Delta\delta_{\max}(6-H) = 0.9356$$

Untersuchung der Carboxymethylpinzette **24** mit Ac-Arg-OMe

Rezeptor	(24)	M_R [g/mol]	726.72
Lösungsmittel	Phosphatpuffer (74 mM)	M_S [g/mol]	266.7
T [°C]	25	m_R [mg]	0.770
Substrat	AcArgOMe	m_S [mg]	0.552
	δ_0 (2-H) [ppm] = 4.414	V_0 [ml]	3.00
	δ_0 (5-H) [ppm] = 3.213	$[S]_0$ [mM]	0.6898
	δ_0 (3-H) [ppm] = 1.656		
	δ_0 (-NAc) [ppm] = 2.041		
X^- : HPO_4^{2-}	δ_0 (-CO ₂ Me) [ppm] = 3.762		

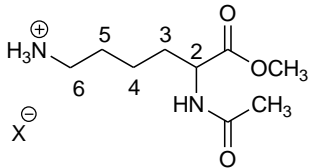
V [ml]	$[R]$ [mM]	δ (5-H) [ppm]	$\Delta\delta_{\text{obs}}$ [ppm]	$\Delta\delta_{\text{calc}}$ [ppm]
0.60	1.7659	2.744	0.4690	0.4846
0.65	1.6301	2.735	0.4780	0.4632
0.70	1.1514	2.750	0.4630	0.4436
0.75	1.4127	2.787	0.4260	0.4254
0.80	1.3244	2.804	0.4090	0.4086
0.85	1.2466	2.820	0.3930	0.3930
0.90	1.1773	2.842	0.3710	0.3784
0.95	1.1153	2.862	0.3510	0.3649
1.00	1.0596	2.876	0.3370	0.3522
1.10	0.9632	2.881	0.3320	0.3293
1.20	0.8829	2.910	0.3030	0.3091
1.30	0.8150	2.924	0.2890	0.2912
1.40	0.7568	2.934	0.2790	0.2752
1.50	0.7064	2.941	0.2720	0.2608
1.60	0.6622	2.955	0.2580	0.2478
0.00	0.0000	3.213	0.0000	0.0000



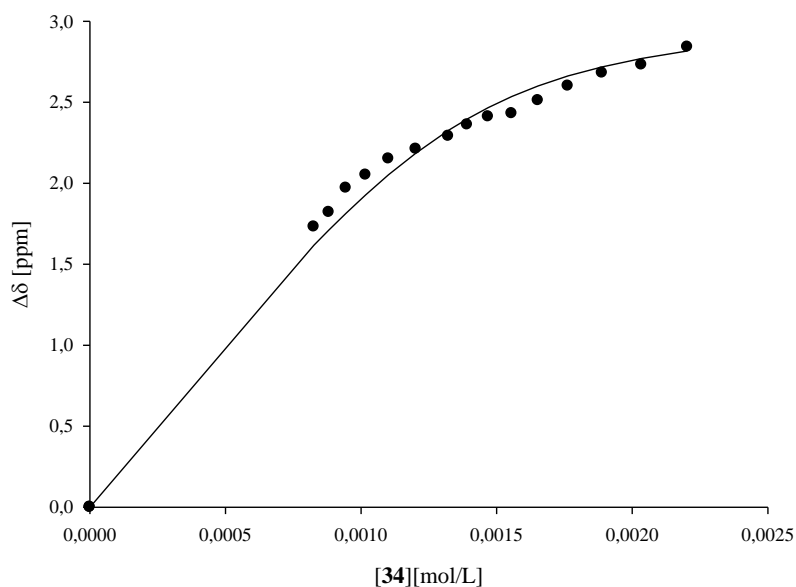
$$K_a [M^{-1}] = 718 \pm 18\%$$

$$\Delta\delta_{\text{max}} (5\text{-H}) [\text{ppm}] = 0.9606$$

Untersuchung der Carboxymethylphosphatpinzette **34** mit Ac-Lys-OMe

Rezeptor	(34)	M_R [g/mol]	770.65
Lösungsmittel	Phosphatpuffer (74 mM)	M_S [g/mol]	238.71
T [°C]	25	m_R [mg]	1.019
Substrat	AcLysOMe	m_S [mg]	0.993
	δ_0 (3a-H) [ppm] = 1.89	V_0 [ml]	3.00
	δ_0 (6-H) [ppm] = 2.97	$[S_0]$ [mM]	1.387
	δ_0 (-Nac) [ppm] = 2.035		
	δ_0 (-CO ₂ Me) [ppm] = 3.750		
X^- : HPO_4^{2-}			

V [ml]	$[R]$ [mM]	δ (6-H) [ppm]	$\Delta\delta_{obs}$ [ppm]	$\Delta\delta_{calc}$ [ppm]
0.60	2.2038	0.1300	2.8400	2.8167
0.65	2.0342	0.2400	2.7300	2.7704
0.70	1.8889	0.2900	2.6800	2.7189
0.75	1.7630	0.4100	2.6000	2.6622
0.80	1.6528	0.4700	2.5100	2.6008
0.85	1.5556	0.5400	2.4300	2.5355
0.90	1.4692	0.5600	2.4100	2.4672
0.95	1.3919	0.6400	2.3600	2.3971
1.00	1.3223	0.6800	2.2900	2.3262
1.10	1.2021	0.7600	2.2100	2.1861
1.20	1.1019	0.8200	2.1500	2.0525
1.30	1.0171	0.8700	2.0500	1.9285
1.40	0.9444	0.9000	1.9700	1.8149
1.50	0.8815	0.9400	1.8200	1.7116
1.60	0.8264	0.9700	1.7300	1.6179
0.00	0.0000	2.9700	0.0000	0.0000

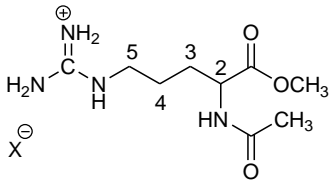


$$K_a [M^{-1}] = 10898 \pm 22 \%$$

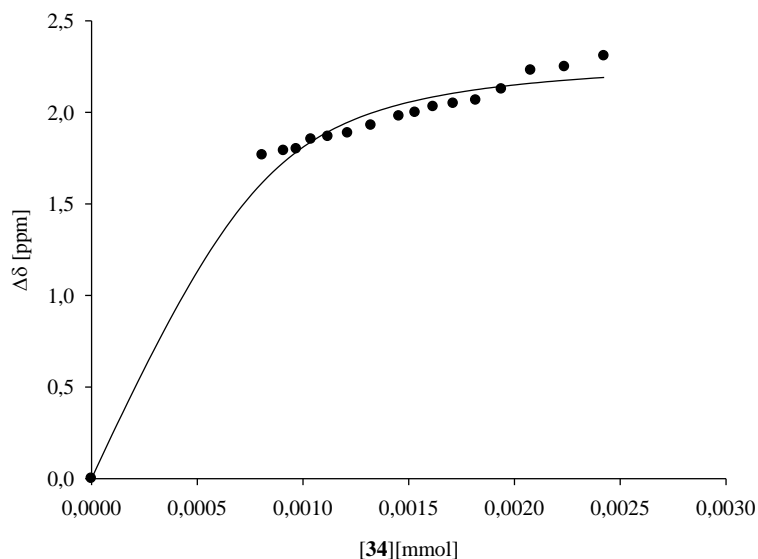
$$\Delta\delta_{max} \text{ (3b-H)} = 1.647 \pm 18 \%$$

$$\Delta\delta_{max} \text{ (6-H)} = 3.09 \pm 7 \%$$

Untersuchung der Carboxymethylpinzette **34** mit Ac-Arg-OMe

Rezeptor	(34)	M_R [g/mol]	726.72
Lösungsmittel	Phosphatpuffer (74 mM)	M_S [g/mol]	266.73
T [°C]	25	m_R [mg]	1.121
Substrat	AcArgOMe	m_S [mg]	0.667
	δ_0 (2-H) [ppm] = 4.392	V_0 [ml]	3.00
	δ_0 (5-H) [ppm] = 3.213	$[S]_0$ [mM]	0.83355
	δ_0 (4-H) [ppm] = 1.644		
	δ_0 (-NAc) [ppm] = 2.028		
X^- : HPO_4^{2-}	δ_0 (-CO ₂ Me) [ppm] = 3.744		

V [ml]	$[R]$ [mM]	δ (5-H) [ppm]	$\Delta\delta_{\text{obs}}$ [ppm]	$\Delta\delta_{\text{calc}}$ [ppm]
0.60	2.4244	0.9060	2.3070	2.1907
0.65	2.2379	0.9650	2.2480	2.1752
0.70	2.0780	0.9840	2.2290	2.1588
0.75	1.9395	1.0870	2.1260	2.1416
0.80	1.8183	1.1480	2.0650	2.1235
0.85	1.7113	1.1660	2.0470	2.1045
0.90	1.6162	1.1830	2.0300	2.0846
0.95	1.5312	1.2150	1.9980	2.0637
1.00	1.4546	1.2350	1.9780	2.0419
1.10	1.3224	1.2850	1.9280	1.9957
1.20	1.2122	1.3270	1.8860	1.9462
1.30	1.1189	1.3460	1.8670	1.8940
1.40	1.0390	1.3610	1.8520	1.8397
1.50	0.9697	1.4140	1.7990	1.7841
1.60	0.9091	1.4230	1.7900	1.7280
0.00	0.0000	3.2130	0.0000	0.0000



$$K_a [M^{-1}] = 10015 \pm 25\%$$

$$\Delta\delta_{\text{max}} (5\text{-H}) [\text{ppm}] = 2.324 \pm 3\%$$

$$\Delta\delta_{\text{max}} (2\text{-H}) [\text{ppm}] = 2.218 \pm 15\%$$

5.4.2 Bestimmung der Assoziationskonstanten K_a durch Fluoreszenztitrationen

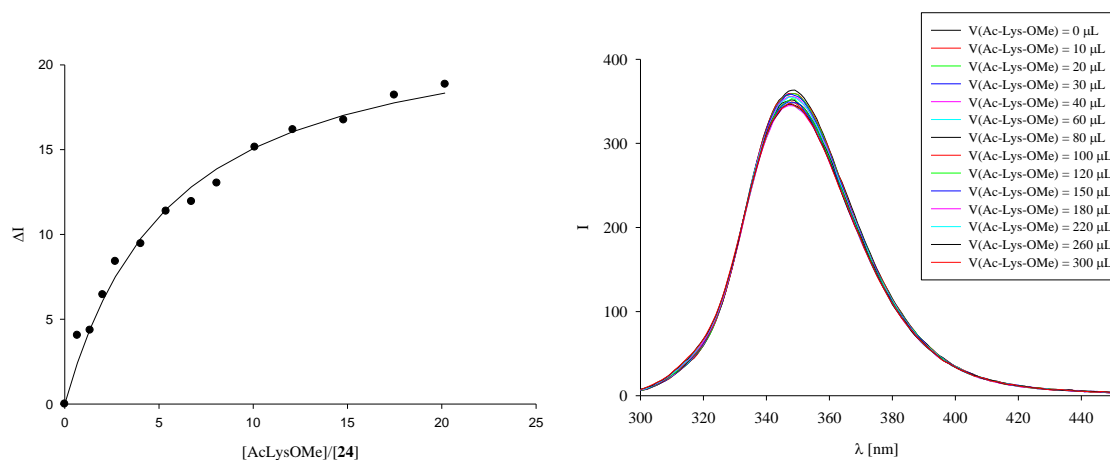
Es wird zunächst eine definierte Menge an Rezeptor (m_R) in Puffer gelöst und ein definiertes Volumen abgenommen, um ein Fluoreszenzspektrum bei einer definierten Anregungswellenlänge aufzunehmen. Dabei wird die Emissionsintensität bei einer definierten Wellenlänge registriert. Zu dieser Rezeptorlösung werden nun während des Experimentes definierte Volumina an Substrat, das in der Rezeptorlösung gelöst vorliegt, hinzugegeben. Nach jedem Titrationsschritt wird erneut ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen und die Änderung der Emissionsintensität notiert. Um die Assoziationskonstanten (K_a) zu bestimmen, werden die Intensitätsänderungen (ΔI_{obs}) und das Verhältnis der Anfangskonzentrationen von Substrat und Rezeptor (ΔI_{obs} vs. $[S]_0[R]_0^{-1}$) mit der Gleichung (1) berechnet und mit dem Programm *SigmaPlot 10.0*^[152] unter Annahme eines 1:1-Komplexes durch eine nicht-lineare Regressionsmethode an die Bindungsisotherme angepasst.

5.4.2.1 Bestimmung der Assoziationskonstanten der Carboxymethylpinzette mit verschiedenen Substraten

Fluoreszenztitration von der Carboxymethylpinzette **24** mit Ac-Lys-OMe · HCl in Phosphatpuffer (200 mM, pH 7.64)

$\lambda_{\text{exc}} = 285 \text{ nm}$	Rezeptor (24)	Gast Ac-Lys-OMe · HCl
Menge [mg]:	0.119	0.184
Volumen [mL]:	4.00	0.40
Konzentration [mol/L]:	$4.094 \cdot 10^{-5}$	$1.93 \cdot 10^{-3}$

Gast V (μL)	Rezeptor V (μL)	[Rezeptor] [mol/L]	[Gast] [mol/L]	[Gast]/ [Rezeptor]	F.I. (I_{349})	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	4.09E-05	0.00E+00	0.000	363.402	0.000	0.0000
10	710	4.09E-05	2.71E-05	0.663	359.354	4.048	2.4168
20	720	4.09E-05	5.35E-05	1.308	359.055	4.347	4.4184
30	730	4.09E-05	7.92E-05	1.934	356.959	6.443	6.0942
40	740	4.09E-05	1.04E-04	2.544	354.993	8.409	7.5123
60	760	4.09E-05	1.52E-04	3.716	353.948	9.454	9.7697
80	780	4.09E-05	1.98E-04	4.828	352.032	11.370	11.4768
100	800	4.09E-05	2.41E-04	5.884	351.464	11.938	12.8070
120	820	4.09E-05	2.82E-04	6.889	350.378	13.024	13.8699
150	850	4.09E-05	3.40E-04	8.307	348.260	15.142	15.1132
180	880	4.09E-05	3.94E-04	9.628	347.229	16.173	16.0644
220	920	4.09E-05	4.61E-04	11.256	346.654	16.748	17.0304
260	960	4.09E-05	5.22E-04	12.749	345.190	18.212	17.7638
300	1000	4.09E-05	5.78E-04	14.122	344.553	18.849	18.3391



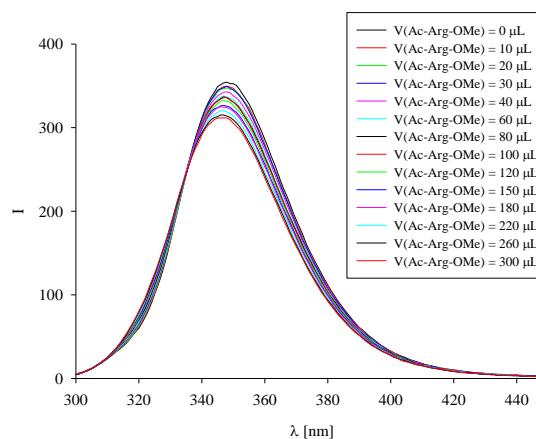
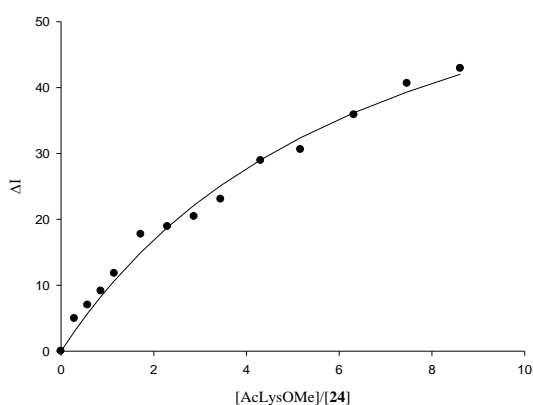
$$K_a [\text{M}^{-1}] = 4434 \pm 14\%$$

$$\Delta I_{\text{max}} = 26$$

Fluoreszenztitration von der Carboxymethylpinzette 24 mit Ac-Arg-OMe · HCl in Phosphatpuffer (200 mM, pH 7.64)

$\lambda_{\text{exc}} = 285 \text{ nm}$	Rezeptor (24)	Gast Ac-Arg-OMe · HCl
Menge [mg]:	0.141	0.208
Volumen [mL]:	2.00	0.40
Konzentration [mol/L]:	$9.70 \cdot 10^{-5}$	$1.95 \cdot 10^{-3}$

Gast V (μL)	Rezeptor V (μL)	[Rezeptor] [mol/L]	[Gast] [mol/L]	[Gast]/ [Rezeptor]	F.I. (I_{348})	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	9.70E-05	0.00E+00	0.000	354.492	0.000	0.0000
10	710	9.70E-05	2.75E-05	0.283	349.540	4.952	2.9700
20	720	9.70E-05	5.42E-05	0.558	347.493	6.999	5.7261
30	730	9.70E-05	8.01E-05	0.826	345.364	9.128	8.2892
40	740	9.70E-05	1.05E-04	1.086	342.694	11.798	10.6780
60	760	9.70E-05	1.54E-04	1.587	336.766	17.726	14.9956
80	780	9.70E-05	2.00E-04	2.061	335.593	18.899	18.7888
100	800	9.70E-05	2.44E-04	2.512	334.062	20.430	22.1443
120	820	9.70E-05	2.85E-04	2.941	331.431	23.061	25.1314
150	850	9.70E-05	3.44E-04	3.546	325.565	28.927	29.0404
180	880	9.70E-05	3.99E-04	4.111	323.905	30.587	32.3905
220	920	9.70E-05	4.66E-04	4.806	318.624	35.868	36.1733
260	960	9.70E-05	5.28E-04	5.443	313.851	40.641	39.3446
300	1000	9.70E-05	5.85E-04	6.029	311.581	42.911	42.0394



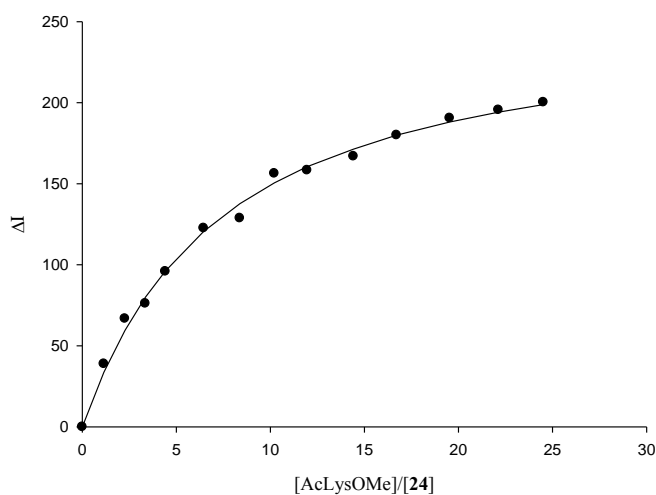
$$K_a [\text{M}^{-1}] = 1134 \pm 26\%$$

$$\Delta I_{\text{max}} = 108$$

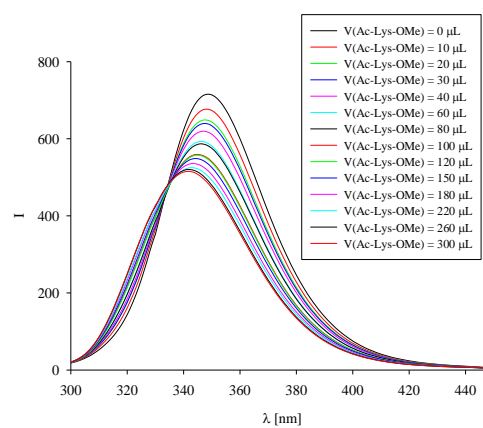
Fluoreszenztitration von der Carboxymethylpinzette 24 mit Ac-Lys-OMe · HCl in Phosphatpuffer (10 mM, pH 7.2)

$\lambda_{\text{exc}} = 285 \text{ nm}$	Rezeptor (24)	Gast Ac-Lys-OMe · HCl
Menge [mg]:	0.492	1.509
Volumen [mL]:	7.00	0.800
Konzentration [mol/L]:	$9.67 \cdot 10^{-5}$	$7.90 \cdot 10^{-3}$

Gast V (μL)	Rezeptor V (μL)	[Rezeptor] [mol/L]	[Gast] [mol/L]	[Gast]/ [Rezeptor]	F.I. (I_{348})	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	9.67E-05	0.00E+00	0.00	715.684	0.000	0.0000
10	710	9.67E-05	1.11E-04	1.151	676.845	38.839	33.7203
20	720	9.67E-05	2.19E-04	2.269	648.935	66.749	59.5512
30	730	9.67E-05	3.25E-04	3.358	639.607	76.077	79.9818
40	740	9.67E-05	4.27E-04	4.416	619.840	95.844	96.1721
60	760	9.67E-05	6.24E-04	6.450	593.112	122.572	120.5213
80	780	9.67E-05	8.10E-04	8.380	586.929	128.755	137.6953
100	800	9.67E-05	9.88E-04	10.213	559.378	156.306	150.5497
120	820	9.67E-05	1.16E-03	11.956	557.382	158.302	160.5912
150	850	9.67E-05	1.39E-03	14.418	548.790	166.894	171.3778
180	880	9.67E-05	1.62E-03	16.712	535.738	179.946	179.9713
220	920	9.67E-05	1.89E-03	19.537	525.169	190.515	188.0593
260	960	9.67E-05	2.14E-03	22.127	520.197	195.487	194.1389
300	1000	9.67E-05	2.37E-03	24.510	515.458	200.226	198.8329



$$K_a [\text{M}^{-1}] = 1555 \pm 7\%$$

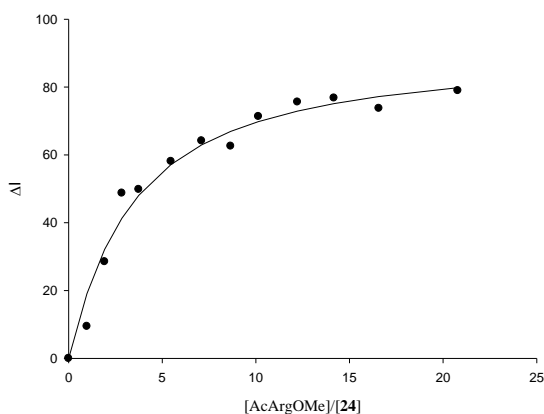


$$\Delta I_{\text{max}} = 255$$

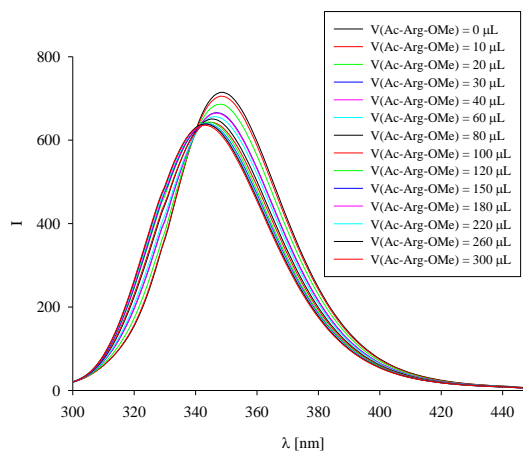
Fluoreszenztitration von der Carboxymethylpinzette 24 mit Ac-Arg-OMe · HCl in Phosphatpuffer (10m M, pH 7.2)

	Rezeptor	Gast
$\lambda_{\text{exc}} = 285 \text{ nm}$	(24)	Ac-Arg-OMe · HCl
Menge [mg]:	0.492	1.43
Volumen [mL]:	7.00	0.8
Konzentration [mol/L]:	$9.67 \cdot 10^{-5}$	$6.70 \cdot 10^{-3}$

Gast	Rezeptor	[Rezeptor]	[Gast]	[Gast]/	F.I.	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
V (μL)	V (μL)	[mol/L]	[mol/L]	[Rezeptor]	(I_{348})		
0	700	9.67E-05	0.00E+00	0.00	714.662	0.000	0.0000
10	710	9.67E-05	9.44E-05	0.976	705.219	9.443	19.7970
20	720	9.67E-05	1.86E-04	1.925	686.177	28.485	32.9222
30	730	9.67E-05	2.75E-04	2.848	665.925	48.737	41.9554
40	740	9.67E-05	3.62E-04	3.745	664.865	49.797	48.4348
60	760	9.67E-05	5.29E-04	5.470	656.591	58.071	56.9735
80	780	9.67E-05	6.87E-04	7.107	650.534	64.128	62.2789
100	800	9.67E-05	8.38E-04	8.661	642.645	62.574	65.8686
120	820	9.67E-05	9.81E-04	10.140	643.352	71.310	68.4499
150	850	9.67E-05	1.18E-03	12.228	639.091	75.571	71.1925
180	880	9.67E-05	1.37E-03	14.173	637.916	76.746	73.1148
220	920	9.67E-05	1.60E-03	16.569	640.940	73.722	74.9300
300	1000	9.67E-05	2.01E-03	20.787	635.733	78.929	77.1957



$$K_a [\text{M}^{-1}] = 3558 \pm 18\%$$

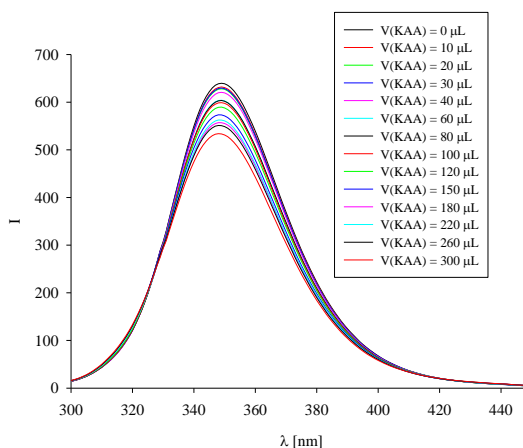
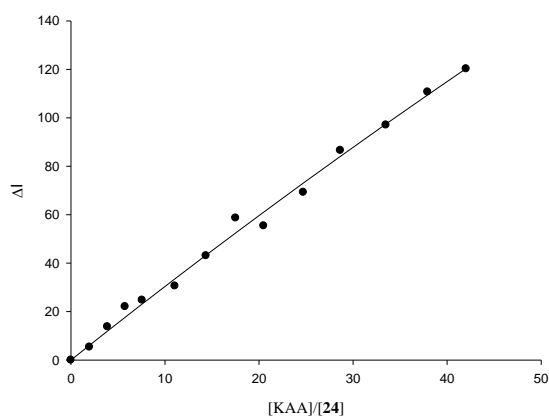


$$\Delta I_{\text{max}} = 91$$

Fluoreszenztitration von der Carboxymethylpinzette 24 mit dem Peptid KAA in Phosphatpuffer (10 mM, pH 7.2)

$\lambda_{\text{exc}} = 285 \text{ nm}$	Rezeptor (24)	Gast KAA
Menge [mg]:	0.215	1.349
Volumen [mL]:	4.50	0.80
Konzentration [mol/L]:	$6.65 \cdot 10^{-5}$	$9.2 \cdot 10^{-3}$

Gast V (μL)	Rezeptor V (μL)	[Rezeptor] [mol/L]	[Gast] [mol/L]	[Gast]/ [Rezeptor]	F.I. (I_{348})	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	6.57E-05	0.00E+00	0.000	476.535	0.000	0.0000
10	710	6.57E-05	1.30E-04	1.973	471.176	5.359	6.0899
20	720	6.57E-05	2.56E-04	3.891	462.806	13.729	11.9661
30	730	6.57E-05	3.78E-04	5.756	454.449	22.086	17.6395
40	740	6.57E-05	4.98E-04	7.572	451.804	24.731	23.1205
60	760	6.57E-05	7.27E-04	11.058	445.960	30.575	33.5432
80	780	6.57E-05	9.45E-04	14.367	433.475	43.060	43.3038
100	800	6.57E-05	1.15E-03	17.509	417.927	58.608	52.4635
120	820	6.57E-05	1.35E-03	20.499	421.166	55.369	61.0761
150	850	6.57E-05	1.63E-03	24.719	407.293	69.242	73.0718
180	880	6.57E-05	1.88E-03	28.652	389.996	86.539	84.0812
220	920	6.57E-05	2.20E-03	33.496	379.260	97.275	97.4253
260	960	6.57E-05	2.49E-03	37.937	365.539	110.996	109.451
300	1000	6.57E-05	2.76E-03	42.022	355.788	120.747	120.344



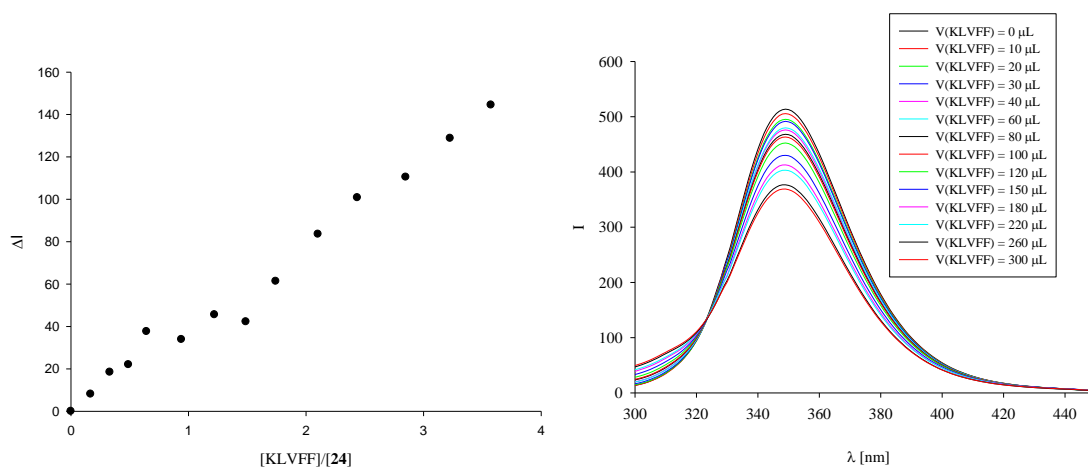
$$K_a [\text{M}^{-1}] = 30 \pm 83\%$$

$$\Delta I_{\text{max}} = 1585$$

Fluoreszenztitration von der Carboxymethylpinzette 24 mit dem Peptid KLVFF in Phosphatpuffer (10 mM, pH 7.2)

$\lambda_{\text{exc}} = 285 \text{ nm}$	Rezeptor (24)	Gast KLVFF
Menge [mg]:	0.084	0.240
Volumen [mL]:	1.50	0.40
Konzentration [mol/L]:	$7.70 \cdot 10^{-5}$	$9.18 \cdot 10^{-4}$

Gast V (μL)	Rezeptor V (μL)	[Rezeptor] [mol/L]	[Gast] [mol/L]	[Gast]/ [Rezeptor]	F.I. (I_{349})	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	7.7059E-05	0.00E+00	0.000	513.638	0.000	
10	710	7.7059E-05	1.29E-05	0.1678	505.543	8.095	
20	720	7.7059E-05	2.55E-05	0.331	495.200	18.438	
30	730	7.7059E-05	3.77E-05	0.490	491.667	21.971	
40	740	7.7059E-05	4.96E-05	0.644	476.059	37.579	
60	760	7.7059E-05	7.25E-05	0.941	479.809	33.829	
80	780	7.7059E-05	9.42E-05	1.222	468.114	45.524	
100	800	7.7059E-05	1.15E-04	1.490	463.327	42.216	
120	820	7.7059E-05	1.34E-04	1.743	452.334	61.304	
150	850	7.7059E-05	1.62E-04	2.102	430.130	83.508	
180	880	7.7059E-05	1.88E-04	2.437	412.854	100.784	
220	920	7.7059E-05	2.20E-04	2.849	403.199	110.439	
260	960	7.7059E-05	2.49E-04	3.226	376.755	128.788	
300	1000	7.7059E-05	2.75E-04	3.574	369.159	144.479	



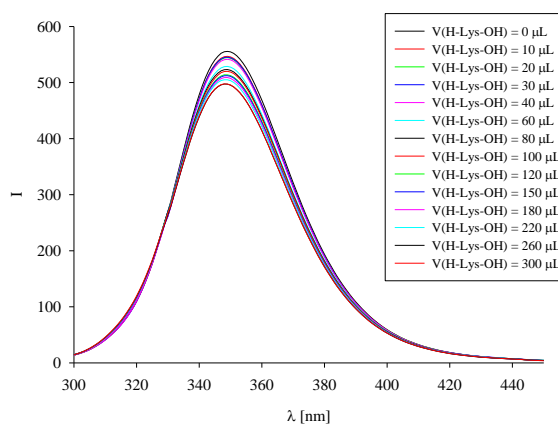
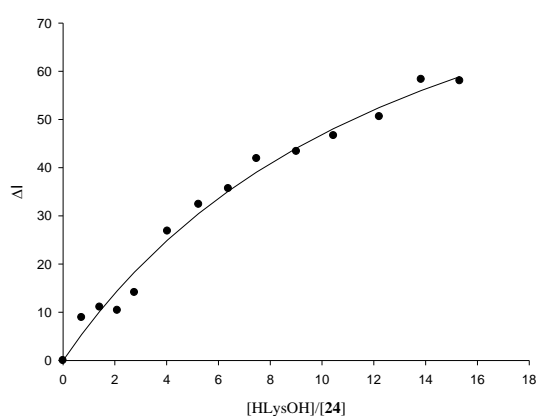
$K_a [\text{M}^{-1}]$ = konnte nicht ausgewertet werden

$\Delta I_{\text{max}} =$

**Fluoreszenztitration von der Carboxymethylpinzette 24 mit H-Lys-OH in
Phosphatpuffer (10 mM, pH 7.2)**

$\lambda_{\text{exc}} = 285 \text{ nm}$	Rezeptor	Gast
$\lambda_{\text{em}} = 348 \text{ nm}$	(24)	H-Lys-OH · HCl
Menge [mg]:	0.259	0.655
Volumen [mL]:	4.00	0.80
Konzentration [mol/L]:	$8.91 \cdot 10^{-5}$	$4.55 \cdot 10^{-3}$

Gast	Rezeptor	[Rezeptor]	[Gast]	[Gast]/	F.I.	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
V (μL)	V (μL)	[mol/L]	[mol/L]	[Rezeptor]	(I_{348})		
0	700	8.91E-05	0.00E+00	0.000	555.580	0.000	0.0000
10	710	8.91E-05	6.41E-05	0.719	546.684	8.896	5.4037
20	720	8.91E-05	1.26E-04	1.418	544.499	11.081	10.2046
30	730	8.91E-05	1.87E-04	2.099	545.179	10.401	14.4953
40	740	8.91E-05	2.46E-04	2.760	541.476	14.104	18.3508
60	760	8.91E-05	3.59E-04	4.031	528.748	26.832	24.9908
80	780	8.91E-05	4.67E-04	5.237	523.192	32.388	30.4993
100	800	8.91E-05	5.69E-04	6.383	519.935	35.645	35.1385
120	820	8.91E-05	6.66E-04	7.473	513.713	41.867	39.0962
150	850	8.91E-05	8.03E-04	9.011	512.214	43.366	44.0476
180	880	8.91E-05	9.31E-04	10.445	508.936	46.644	48.0994
220	920	8.91E-05	1.09E-03	12.211	504.988	50.592	52.4776
260	960	8.91E-05	1.23E-03	13.830	497.261	58.319	55.9979
300	1000	8.91E-05	1.36E-03	15.319	497.562	58.018	58.8887



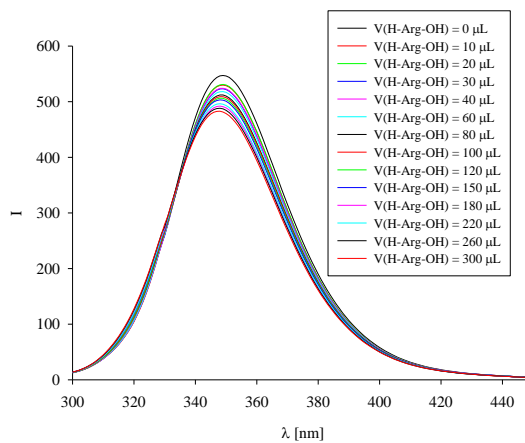
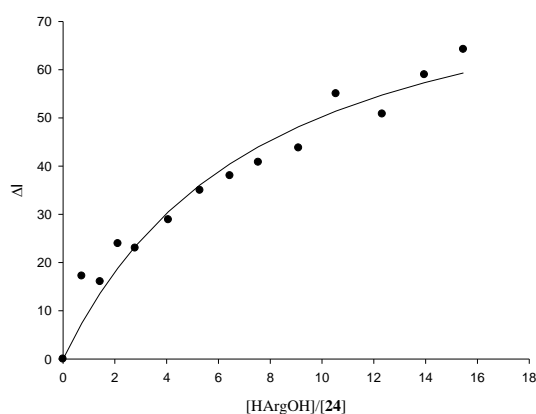
$$K_a [\text{M}^{-1}] = 855 \pm 20\%$$

$$\Delta I_{\text{max}} = 111$$

**Fluoreszenztitration von der Carboxymethylpinzette 24 mit H-Arg-OH in
Phosphatpuffer (10 mM, pH 7.2)**

$\lambda_{\text{exc}} = 285 \text{ nm}$	Rezeptor	Gast
$\lambda_{\text{em}} = 348 \text{ nm}$	(24)	H-Arg-OH · HCl
Menge [mg]:	0.259	0.774
Volumen [mL]:	4.00	0.80
Konzentration [mol/L]:	$8.91 \cdot 10^{-5}$	$4.59 \cdot 10^{-3}$

Gast V (μL)	Rezeptor V (μL)	[Rezeptor] [mol/L]	[Gast] [mol/L]	[Gast]/ [Rezeptor]	F.I. (I_{338})	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	8.91E-05	0.00E+00	0.00	547.049	0.000	0.0000
10	710	8.91E-05	6.47E-05	0.726	529.854	17.195	7.4316
20	720	8.91E-05	1.28E-04	1.432	531.017	16.032	13.6360
30	730	8.91E-05	1.89E-04	2.118	523.134	23.915	18.8764
40	740	8.91E-05	2.48E-04	2.786	524.054	22.995	23.3500
60	760	8.91E-05	3.63E-04	4.069	518.176	28.873	30.5603
80	780	8.91E-05	4.71E-04	5.286	512.063	34.986	36.0975
100	800	8.91E-05	5.74E-04	6.442	509.052	37.997	40.4704
120	820	8.91E-05	6.72E-04	7.542	506.257	40.792	44.0047
150	850	8.91E-05	8.10E-04	9.095	503.272	43.777	48.1879
180	880	8.91E-05	9.39E-04	10.542	492.028	55.021	51.4265
220	920	8.91E-05	1.10E-03	12.324	496.235	50.814	54.7516
260	960	8.91E-05	1.24E-03	13.958	488.097	58.952	57.3016
300	1000	8.91E-05	1.38E-03	15.461	482.845	64.204	59.3180



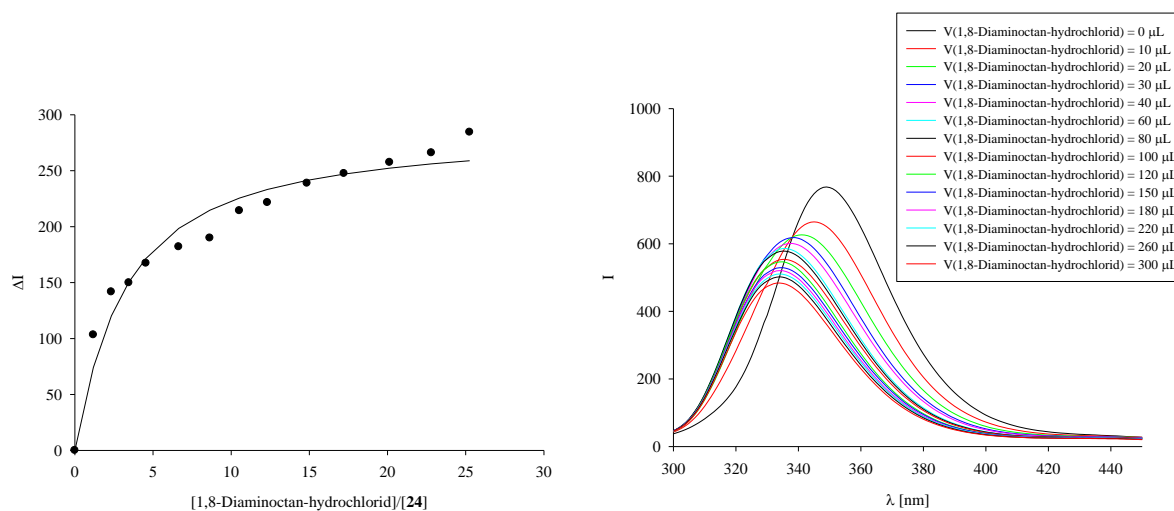
$$K_a [\text{M}^{-1}] = 1643 \pm 27\%$$

$$\Delta I_{\text{max}} = 87$$

Fluoreszenztitration von der Carboxymethylpinzette 24 mit 1,8-Diaminooctan-hydrochlorid in Phosphatpuffer (10 mM, pH 7.2)

$\lambda_{\text{exc}} = 285 \text{ nm}$	Rezeptor	Gast
$\lambda_{\text{em}} = 349 \text{ nm}$	(24)	1,8-Diaminooctan · HCl
Menge [mg]:	0.11	1.107
Volumen [mL]:	2.00	0.80
Konzentration [mol/L]:	$7.57 \cdot 10^{-5}$	$6.37 \cdot 10^{-3}$

Gast	Rezeptor	[Rezeptor]	[Gast]	[Gast]/	F.I.	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
V (μL)	V (μL)	[mol/L]	[mol/L]	[Rezeptor]	(I_{349})		
0	700	7.57E-05	0.00E+00	0.000	768.169	0.000	0.0000
10	710	7.57E-05	8.97E-05	1.186	664.942	103.227	74.1550
20	720	7.57E-05	1.77E-04	2.339	626.449	141.720	120.2654
30	730	7.57E-05	2.62E-04	3.459	618.375	149.794	150.5446
40	740	7.57E-05	3.44E-04	4.551	600.933	167.236	171.5605
60	760	7.57E-05	5.03E-04	6.646	586.141	182.028	198.4208
80	780	7.57E-05	6.53E-04	8.635	578.346	189.823	214.6740
100	800	7.57E-05	7.96E-04	10.523	553.934	214.235	225.4994
120	820	7.57E-05	9.32E-04	12.319	546.632	221.537	233.2052
150	850	7.57E-05	1.12E-03	14.856	529.308	238.861	241.3252
180	880	7.57E-05	1.30E-03	17.219	520.744	247.425	246.9778
220	920	7.57E-05	1.52E-03	20.132	510.726	257.443	252.2881
260	960	7.57E-05	1.73E-03	22.800	502.138	266.031	256.0620
300	1000	7.57E-05	1.91E-03	25.256	483.799	284.370	258.8811



$$K_a [\text{M}^{-1}] = 4958 \pm 20\%$$

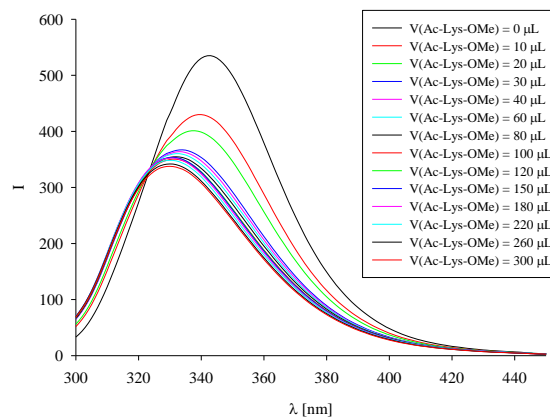
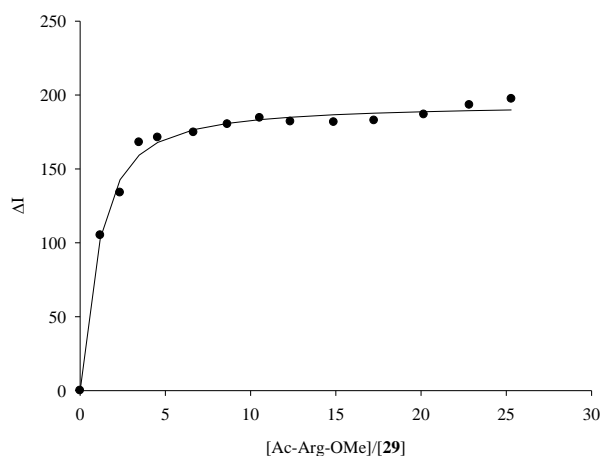
$$\Delta I_{\text{max}} = 287$$

5.4.2.2 Bestimmung der Assoziationskonstanten der Methoxyphosphatpinzette mit verschiedenen Substraten

Fluoreszenztitration von der Methoxyphosphatpinzette 29 mit Ac-Lys-OMe · HCl in Phosphatpuffer (10 mM, pH 7.2)

$\lambda_{\text{exc}} = 285 \text{ nm}$	Rezeptor (29)	Gast Ac-Lys-OMe · HCl
Menge [mg]:	0.304	1.058
Volumen [mL]:	6.00	0.800
Konzentration [mol/L]:	$7.19 \cdot 10^{-5}$	$5.54 \cdot 10^{-3}$

Gast V (μL)	Rezeptor V (μL)	[Rezeptor] [mol/L]	[Gast] [mol/L]	[Gast]/ [Rezeptor]	F.I. (I_{343})	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	7.19E-05	0.0000	0.0000	535.0180	0.0000	0.0000
10	710	7.19E-05	8.54E-05	1.1878	429.9110	105.1070	103.0820
20	720	7.19E-05	1.68E-04	2.3426	401.0750	133.9430	142.7324
30	730	7.19E-05	2.49E-04	3.4658	367.0290	167.9890	159.3577
40	740	7.19E-05	3.28E-04	4.5586	363.8030	171.2150	167.9647
60	760	7.19E-05	4.79E-04	6.6580	360.3270	174.6910	176.5670
80	780	7.19E-05	6.22E-04	8.6497	354.7720	180.2460	180.8154
100	800	7.19E-05	7.58E-04	10.5418	350.5240	184.4940	183.3362
120	820	7.19E-05	8.87E-04	12.3416	352.9850	182.0330	185.0024
150	850	7.19E-05	1.07E-03	14.8826	353.4310	181.5870	186.6560
180	880	7.19E-05	1.24E-03	17.2502	352.2680	182.7500	187.7508
220	920	7.19E-05	1.45E-03	20.1669	348.2370	186.7810	188.7405
260	960	7.19E-05	1.64E-03	22.8406	341.7500	193.2680	189.4225
300	1000	7.19E-05	1.82E-03	25.3003	337.6090	197.4090	189.9209



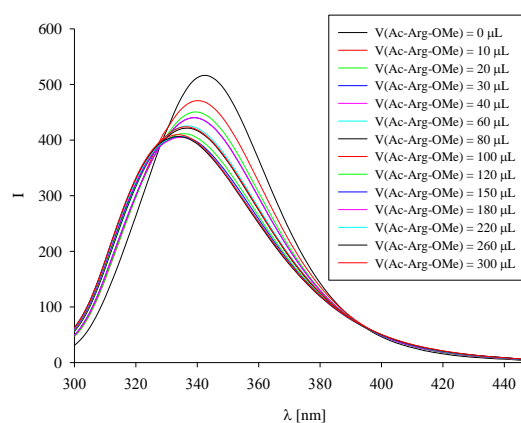
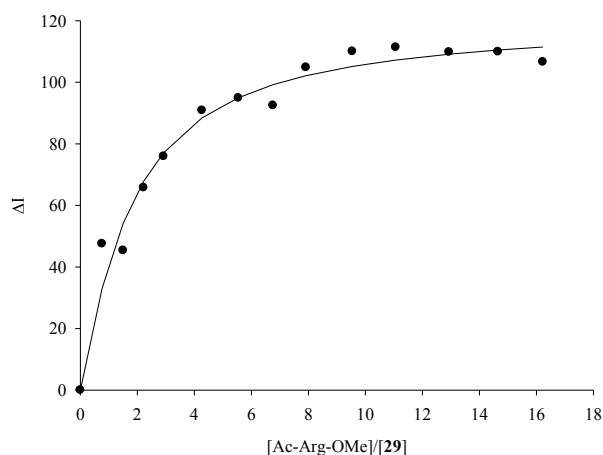
$$K_a [\text{M}^{-1}] = 23849 \pm 11\%$$

$$\Delta I_{\text{max}} = 194$$

Fluoreszenztitration von der Methoxyphosphatpinzette 29 mit Ac-Arg-OMe · HCl in Phosphatpuffer (10m M, pH 7.2)

$\lambda_{\text{exc}} = 285 \text{ nm}$	Rezeptor (29)	Gast Ac-Arg-OMe · HCl
Menge [mg]:	0.126	1.032
Volumen [mL]:	2.00	0.8
Konzentration [mol/L]:	$8.94 \cdot 10^{-5}$	$4.84 \cdot 10^{-3}$

Gast V (μL)	Rezeptor V (μL)	[Rezeptor] [mol/L]	[Gast] [mol/L]	[Gast]/ [Rezeptor]	F.I. (I_{342})	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	8.94E-05	0.00E+00	0.00	516.286	0.000	0.0000
10	710	8.94E-05	6.81E-05	0.726	468.764	47.522	33.0515
20	720	8.94E-05	1.34E-04	1.503	470.929	45.357	54.1819
30	730	8.94E-05	1.99E-04	2.223	450.532	65.754	67.8681
40	740	8.94E-05	2.61E-04	2.924	440.380	75.906	77.1075
60	760	8.94E-05	3.82E-04	4.270	425.428	90.858	88.4485
80	780	8.94E-05	4.96E-04	5.548	421.397	94.889	94.9986
100	800	8.94E-05	6.05E-04	6.762	423.814	92.472	99.2158
120	820	8.94E-05	7.08E-04	7.916	411.456	104.830	102.1439
150	850	8.94E-05	8.53E-04	9.546	406.260	110.026	105.1615
180	880	8.94E-05	9.89E-04	11.065	404.940	111.346	107.2208
220	920	8.94E-05	1.16E-03	12.936	406.508	109.778	109.1242
260	960	8.94E-05	1.31E-03	14.651	406.355	109.931	110.4586
300	1000	8.94E-05	1.45E-03	16.228	409.676	106.610	111.4455



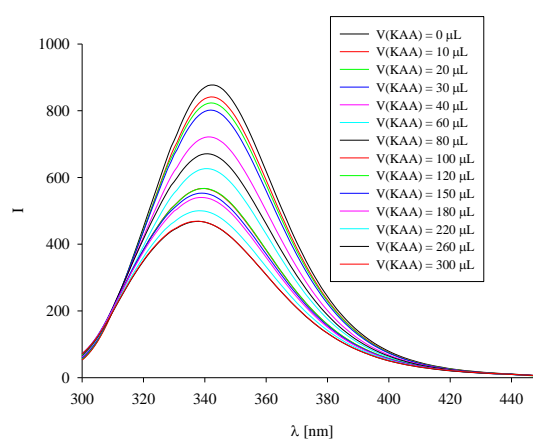
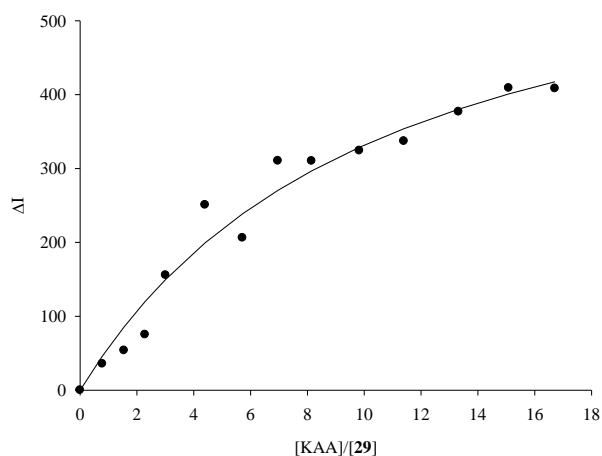
$$K_a [\text{M}^{-1}] = 8614 \pm 18\%$$

$$\Delta I_{\text{max}} = 121$$

Fluoreszenztitration von der Methoxyphosphatpinzette 29 mit dem Peptid KAA in Phosphatpuffer (10 mM, pH 7.2)

$\lambda_{\text{exc}} = 285 \text{ nm}$	Rezeptor (29)	Gast KAA
Menge [mg]:	0.304	0.924
Volumen [mL]:	6.00	0.80
Konzentration [mol/L]:	$7.19 \cdot 10^{-5}$	$4.00 \cdot 10^{-3}$

Gast V (μL)	Rezeptor V (μL)	[Rezeptor] [mol/L]	[Gast] [mol/L]	[Gast]/ [Rezeptor]	F.I. (I_{342})	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	7.19E-05	0.00E+00	0.000	877.179	0.000	0.0000
10	710	7.19E-05	5.64E-05	0.785	841.550	35.629	46.2060
20	720	7.19E-05	1.22E-04	1.547	823.453	53.726	85.7995
30	730	7.19E-05	1.65E-04	2.289	802.055	75.124	120.0446
40	740	7.19E-05	2.17E-04	3.011	721.636	155.543	149.9164
60	760	7.19E-05	3.16E-04	4.398	626.528	250.651	199.4193
80	780	7.19E-05	4.11E-04	5.714	671.073	206.106	238.6818
100	800	7.19E-05	5.01E-04	6.964	566.759	310.420	270.5253
120	820	7.19E-05	5.86E-04	8.152	567.082	310.097	296.8390
150	850	7.19E-05	7.07E-04	9.831	552.956	324.223	328.6923
180	880	7.19E-05	8.19E-04	11.395	540.116	337.063	353.9081
220	920	7.19E-05	9.58E-04	13.322	500.249	376.930	380.3271
260	960	7.19E-05	1.08E-03	15.088	468.292	408.887	400.9680
300	1000	7.19E-05	1.20E-03	16.712	468.827	408.352	417.5307



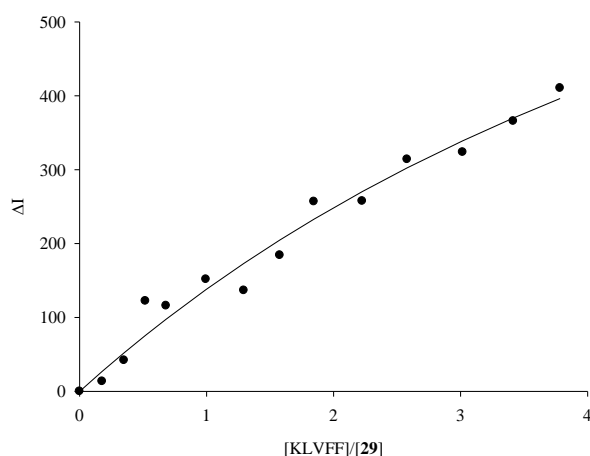
$$K_a [\text{M}^{-1}] = 1447 \pm 26\%$$

$$\Delta I_{\text{max}} = 667$$

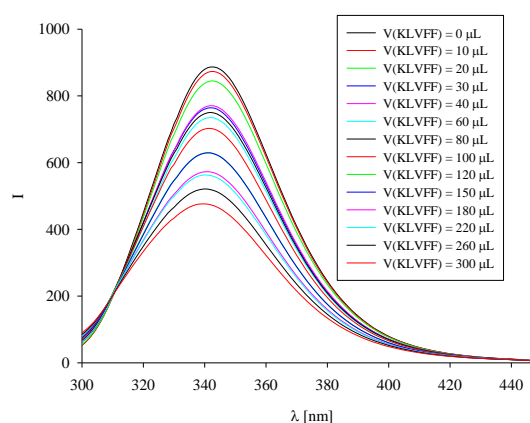
Fluoreszenztitration von der Methoxyphosphatpinzette 29 mit dem Peptid KLVFF in Phosphatpuffer (10 mM, pH 7.2)

$\lambda_{\text{exc}} = 285 \text{ nm}$	Rezeptor (29)	Gast KLVFF
Menge [mg]:	0.196	0.229
Volumen [mL]:	4.00	0.40
Konzentration [mol/L]:	$6.95 \cdot 10^{-5}$	$8.77 \cdot 10^{-4}$

Gast V (μL)	Rezeptor V (μL)	[Rezeptor] [mol/L]	[Gast] [mol/L]	[Gast]/ [Rezeptor]	F.I. (I_{342})	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	6.95E-05	0.00E+00	0.000	886.740	0.000	0.000
10	710	6.95E-05	1.24E-05	0.177	873.200	13.540	27.0234
20	720	6.95E-05	2.44E-05	0.350	844.815	41.925	52.2146
30	730	6.95E-05	3.60E-05	0.518	764.512	122.228	75.7449
40	740	6.95E-05	4.74E-05	0.682	770.833	115.907	97.7660
60	760	6.95E-05	6.92E-05	0.996	735.125	151.615	137.8042
80	780	6.95E-05	8.99E-05	1.293	750.248	136.492	173.2385
100	800	6.95E-05	1.10E-04	1.576	702.537	184.203	204.7954
120	820	6.95E-05	1.28E-04	1.846	629.999	256.741	233.0607
150	850	6.95E-05	1.55E-04	2.226	629.272	257.468	270.3053
180	880	6.95E-05	1.79E-04	2.579	572.838	313.902	302.4622
220	920	6.95E-05	2.10E-04	3.016	563.058	323.682	339.0447
260	960	6.95E-05	2.38E-04	3.416	521.057	365.682	369.9413
300	1000	6.95E-05	2.63E-04	3.783	476.342	410.398	396.3654



$$K_a [\text{M}^{-1}] = 2366 \pm 47\%$$

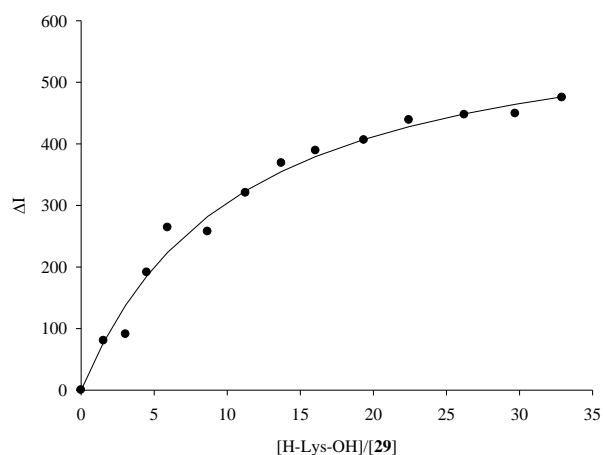


$$\Delta I_{\text{max}} = 1100$$

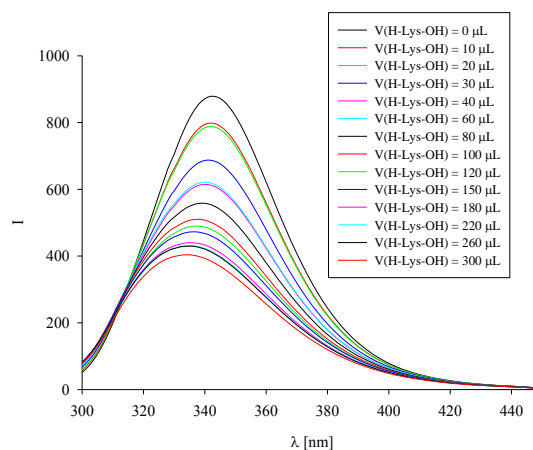
Fluoreszenztitration von der Methoxyphosphatpinzette 29 mit H-Lys-OH in Phosphatpuffer (10 mM, pH 7.2)

$\lambda_{\text{exc}} = 285 \text{ nm}$	Rezeptor	Gast
$\lambda_{\text{em}} = 342 \text{ nm}$	(29)	H-Lys-OH · HCl
Menge [mg]:	0.343	1.301
Volumen [mL]:	6.00	0.80
Konzentration [mol/L]:	$8.11 \cdot 10^{-5}$	$8.90 \cdot 10^{-3}$

Gast	Rezeptor	[Rezeptor]	[Gast]	[Gast]/	F.I.	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
V (μL)	V (μL)	[mol/L]	[mol/L]	[Rezeptor]	(I_{342})		
0	700	8.11E-05	0.00E+00	0.000	878.844	0.000	0.0000
10	710	8.11E-05	1.25E-04	1.545	798.668	80.176	77.9281
20	720	8.11E-05	2.47E-04	3.048	788.161	90.683	137.9991
30	730	8.11E-05	3.66E-04	4.509	687.736	191.108	185.5052
40	740	8.11E-05	4.81E-04	5.931	614.851	263.993	223.9036
60	760	8.11E-05	7.03E-04	8.662	621.353	257.491	281.9770
80	780	8.11E-05	9.13E-04	11.253	558.492	320.350	323.6725
100	800	8.11E-05	1.11E-03	13.715	510.254	368.590	354.9888
120	820	8.11E-05	1.30E-03	16.057	489.979	388.865	379.3397
150	850	8.11E-05	1.57E-03	19.362	472.754	406.090	407.1324
180	880	8.11E-05	1.82E-03	22.443	440.157	438.687	427.9325
220	920	8.11E-05	2.13E-03	26.237	431.650	447.194	448.6795
260	960	8.11E-05	2.41E-03	29.716	429.857	448.987	464.1970
300	1000	8.11E-05	2.67E-03	32.916	403.812	475.032	476.2367



$$K_a [\text{M}^{-1}] = 1240 \pm 14\%$$

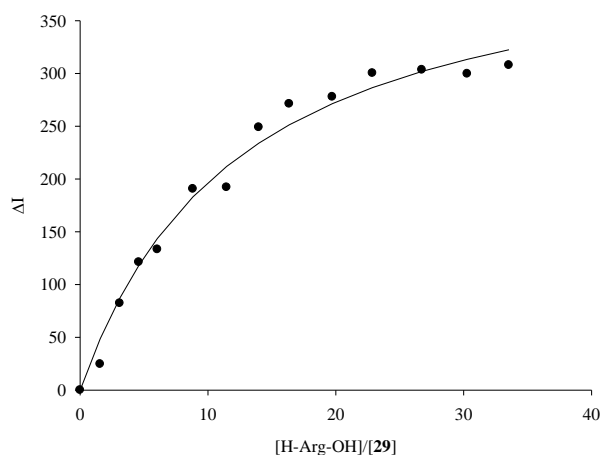


$$\Delta I_{\text{max}} = 624$$

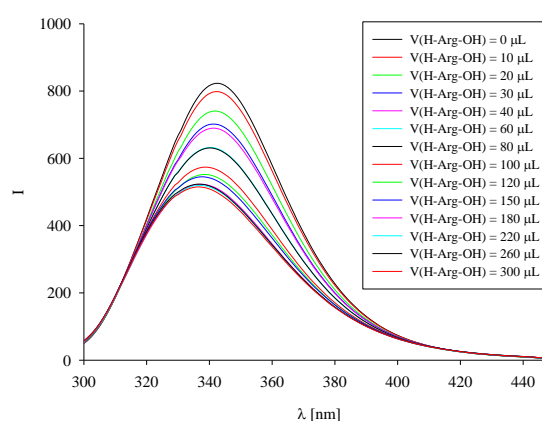
Fluoreszenztitration von der Methoxyphosphatpinzette 29 mit H-Arg-OH in Phosphatpuffer (10 mM, pH 7.2)

$\lambda_{\text{exc}} = 285 \text{ nm}$	Rezeptor	Gast
$\lambda_{\text{em}} = 342 \text{ nm}$	(29)	H-Arg-OH · HCl
Menge [mg]:	0.304	1.355
Volumen [mL]:	6.00	0.80
Konzentration [mol/L]:	$7.19 \cdot 10^{-5}$	$8.04 \cdot 10^{-3}$

Gast	Rezeptor	[Rezeptor]	[Gast]	[Gast]/	F.I.	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
V (μL)	V (μL)	[mol/L]	[mol/L]	[Rezeptor]	(I_{342})		
0	700	7.19E-05	0.00E+00	0.00	822.979	0.000	0.0000
10	710	7.19E-05	1.13E-05	1.575	798.339	24.640	48.7154
20	720	7.19E-05	2.23E-04	3.106	740.753	82.226	87.1753
30	730	7.19E-05	3.30E-04	4.595	701.848	121.131	118.2081
40	740	7.19E-05	4.35E-04	6.043	689.627	133.352	143.7201
60	760	7.19E-05	6.35E-04	8.826	632.373	190.606	183.0831
80	780	7.19E-05	8.24E-04	11.467	630.868	192.111	211.9595
100	800	7.19E-05	1.00E-03	13.975	573.986	248.993	234.0041
120	820	7.19E-05	1.18E-03	16.361	551.887	271.092	251.3649
150	850	7.19E-05	1.42E-03	19.729	545.191	277.788	271.4210
180	880	7.19E-05	1.64E-03	22.868	522.721	300.258	286.6038
220	920	7.19E-05	1.92E-03	26.735	519.543	303.436	301.8985
260	960	7.19E-05	2.18E-03	30.279	523.274	299.705	313.4379
300	1000	7.19E-05	2.41E-03	33.540	515.069	307.910	322.4510



$$K_a [\text{M}^{-1}] = 1192 \pm 14\%$$

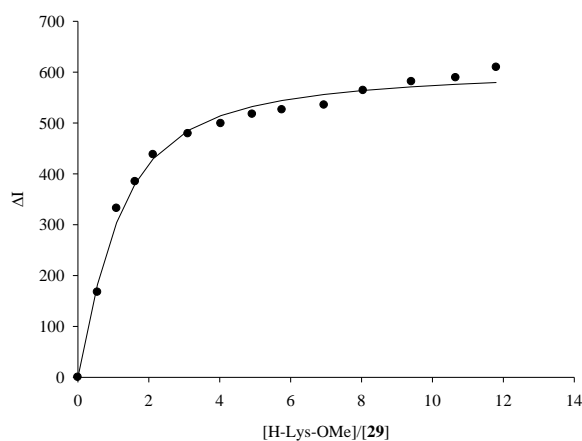


$$\Delta I_{\text{max}} = 437$$

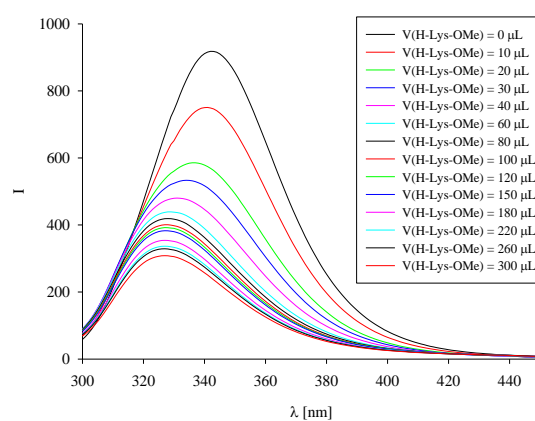
Fluoreszenztitration von der Methoxyphosphatpinzette 29 mit H-Lys-OMe · HCl in Phosphatpuffer (10m M, pH 7.2)

$\lambda_{\text{exc}} = 285 \text{ nm}$	Rezeptor (29)	Gast H-Lys-OMe · HCl
Menge [mg]:	0.100	0.739
Volumen [mL]:	2.00	0.8
Konzentration [mol/L]:	$7.10 \cdot 10^{-5}$	$2.79 \cdot 10^{-3}$

Gast V (μL)	Rezeptor V (μL)	[Rezeptor] [mol/L]	[Gast] [mol/L]	[Gast]/ [Rezeptor]	F.I. (I_{342})	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	7.10E-05	0.0000	0.0000	917.8870	0.0000	0.0000
10	710	7.10E-05	3.93E-05	0.5543	750.5460	167.3410	182.3800
20	720	7.10E-05	7.76E-05	1.0932	585.6300	332.2570	304.0934
30	730	7.10E-05	1.15E-04	1.6173	533.3120	384.5750	380.8484
40	740	7.10E-05	1.51E-04	2.1272	480.2350	437.6520	429.7989
60	760	7.10E-05	2.21E-04	3.1069	439.0810	478.8060	485.2437
80	780	7.10E-05	2.86E-04	4.0363	419.0990	498.7880	514.5903
100	800	7.10E-05	3.49E-04	4.9192	400.6720	517.2150	532.4130
120	820	7.10E-05	4.09E-04	5.7591	392.1080	525.7790	544.2993
150	850	7.10E-05	4.93E-04	6.9448	382.8170	535.0700	556.1399
180	880	7.10E-05	5.71E-04	8.0496	354.0370	563.8500	563.9874
220	920	7.10E-05	6.68E-04	9.4107	336.7020	581.1850	571.0773
260	960	7.10E-05	7.56E-04	10.6583	328.9630	588.9240	575.9563
300	1000	7.10E-05	8.38E-04	11.8061	308.4040	609.4830	579.5169



$$K_a[\text{M}^{-1}] = 23376 \pm 12\%$$

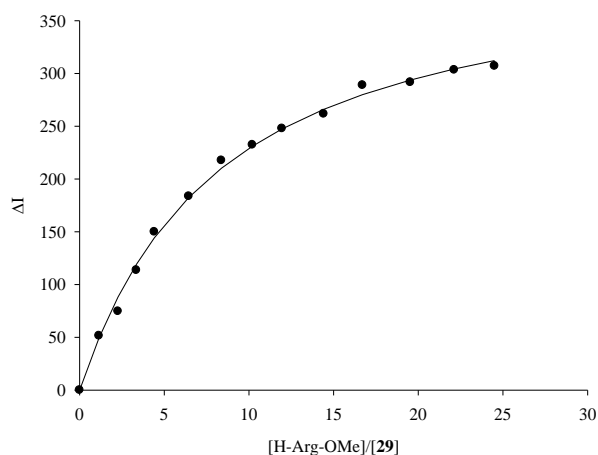


$$\Delta I_{\text{max}} = 612$$

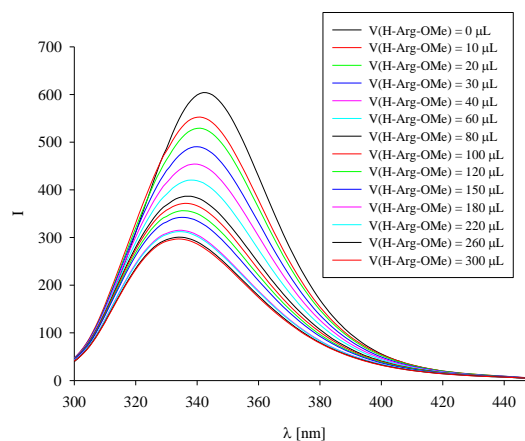
Fluoreszenztitration von der Methoxyphosphatpinzette 29 mit H-Arg-OMe · HCl in Phosphatpuffer (10m M, pH 7.2)

$\lambda_{\text{exc}} = 285 \text{ nm}$	Rezeptor (29)	Gast H-Arg-OMe · HCl
Menge [mg]:	0.164	0.993
Volumen [mL]:	4.00	0.8
Konzentration [mol/L]:	$5.82 \cdot 10^{-5}$	$4.75 \cdot 10^{-3}$

Gast V (μL)	Rezeptor V (μL)	[Rezeptor] [mol/L]	[Gast] [mol/L]	[Gast]/ [Rezeptor]	F.I. (I_{342})	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
0	700	5.82E-05	0.00E+00	0.00	604.088	0.000	0.0000
10	710	5.82E-05	6.69E-05	1.150	552.620	51.468	49.5756
20	720	5.82E-05	1.32E-04	2.269	529.439	74.649	88.2920
30	730	5.82E-05	1.95E-04	3.356	490.462	113.626	119.1955
40	740	5.82E-05	2.57E-04	4.414	454.165	149.923	144.3430
60	760	5.82E-05	3.75E-04	6.448	420.535	183.553	182.6317
80	780	5.82E-05	4.87E-04	8.377	386.551	217.537	210.2868
100	800	5.82E-05	5.94E-04	10.209	371.742	232.346	231.1337
120	820	5.82E-05	6.95E-04	11.952	356.240	247.848	247.3818
150	850	5.82E-05	8.39E-04	14.413	342.380	261.708	265.9602
180	880	5.82E-05	9.72E-04	16.706	315.217	288.871	279.8838
220	920	5.82E-05	1.14E-03	19.531	312.433	291.655	293.7848
260	960	5.82E-05	1.29E-03	22.119	300.718	303.370	304.1883
300	1000	5.82E-05	1.43E-03	24.502	297.042	297.046	312.2630



$$K_a [\text{M}^{-1}] = 2290 \pm 6\%$$



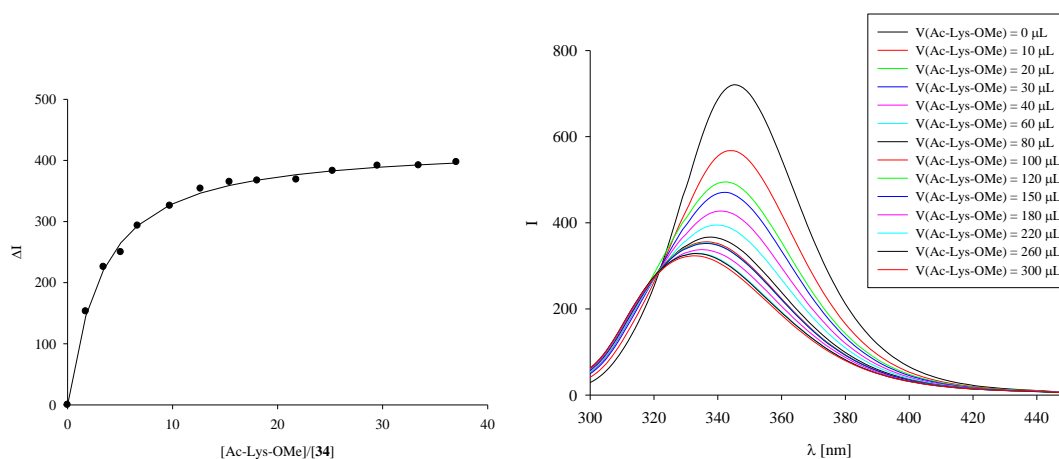
$$\Delta I_{\text{max}} = 411$$

5.4.2.3 Bestimmung der Assoziationskonstanten der Carboxymethylphosphatpinzette mit verschiedenen Substraten

Fluoreszenztitration von der Carboxymethylphosphatpinzette **34** mit Ac-Lys-OMe · HCl in Phosphatpuffer (10 mM, pH 7.2)

$\lambda_{\text{exc}} = 285 \text{ nm}$	Rezeptor	Gast
	(34)	Ac-Lys-OMe · HCl
Menge [mg]:	0.158	0.604
Volumen [mL]:	8.00	0.800
Konzentration [mol/L]:	$2.56 \cdot 10^{-5}$	$3.16 \cdot 10^{-3}$

Gast	Rezeptor	[Rezeptor]	[Gast]	[Gast]/	F.I.	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
V (μL)	V (μL)	[mol/L]	[mol/L]	[Rezeptor]	(I_{346})		
0	700	2.56E-05	0.0000	0.0000	720.5250	0.0000	0.0000
10	710	2.56E-05	4.45E-05	1.7382	567.6470	152.8780	145.3887
20	720	2.56E-05	8.79E-05	3.4282	494.7360	225.7890	220.9989
30	730	2.56E-05	1.30E-04	5.0718	470.6730	249.8520	265.0654
40	740	2.56E-05	1.71E-04	6.6711	427.4030	293.1220	293.3753
60	760	2.56E-05	2.50E-04	9.7433	394.7620	325.7630	327.2009
80	780	2.56E-05	3.24E-04	12.6579	366.7880	353.7370	346.5476
100	800	2.56E-05	3.95E-04	15.4268	355.8130	364.7120	359.0210
120	820	2.56E-05	4.63E-04	18.0607	353.5080	367.0170	367.7163
150	850	2.56E-05	5.58E-04	21.7790	351.9120	368.6130	376.7256
180	880	2.56E-05	6.47E-04	25.2439	337.6830	382.8420	382.9100
220	920	2.56E-05	7.56E-04	29.5122	329.3100	391.2150	388.6581
260	960	2.56E-05	8.57E-04	33.4248	328.6850	391.8400	392.7087
300	1000	2.56E-05	9.49E-04	37.0244	323.3380	397.1870	395.7163



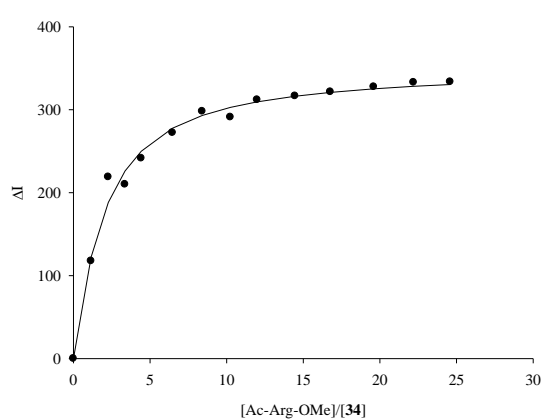
$$K_a [\text{M}^{-1}] = 14522 \pm 5\%$$

$$\Delta I_{\text{max}} = 425$$

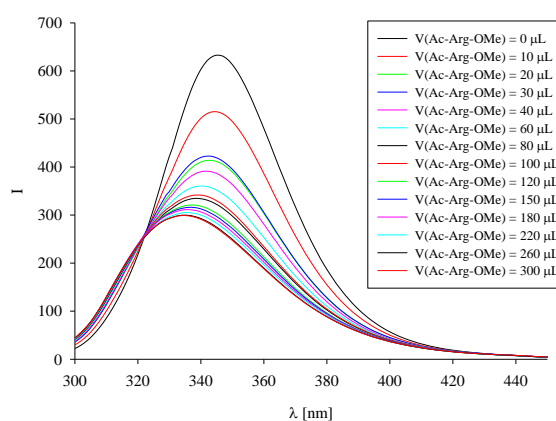
Fluoreszenztitration von der Carboxymethylphosphatpinzette **34** mit Ac-ArgO-Me · HCl in Phosphatpuffer (10m M, pH 7.2)

$\lambda_{\text{exc}} = 285 \text{ nm}$	Rezeptor	Gast
	(34)	Ac-Arg-OMe · HCl
Menge [mg]:	0.405	1.149
Volumen [mL]:	8.00	0.8
Konzentration [mol/L]:	$6.57 \cdot 10^{-5}$	$5.38 \cdot 10^{-3}$

Gast	Rezeptor	[Rezeptor]	[Gast]	[Gast]/	F.I.	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
V (μL)	V (μL)	[mol/L]	[mol/L]	[Rezeptor]	(I_{345})		
0	700	6.57E-05	0.00E+00	0.00	623.715	0.000	0.0000
10	710	6.57E-05	7.58E-05	1.154	515.158	117.557	122.4085
20	720	6.57E-05	1.50E-04	2.277	413.875	218.840	188.3095
30	730	6.57E-05	2.21E-04	3.369	422.767	209.948	226.2282
40	740	6.57E-05	2.91E-04	4.431	391.272	241.443	250.0536
60	760	6.57E-05	4.25E-04	6.471	360.428	272.287	277.7317
80	780	6.57E-05	5.52E-04	8.407	334.752	297.963	293.0995
100	800	6.57E-05	6.73E-04	10.246	341.764	290.951	302.8101
120	820	6.57E-05	7.88E-04	11.995	320.794	311.921	309.4835
150	850	6.57E-05	9.50E-04	14.465	316.156	316.559	316.3126
180	880	6.57E-05	1.10E-03	16.766	311.292	321.423	320.9494
220	920	6.57E-05	1.29E-03	19.601	305.134	327.581	325.2213
260	960	6.57E-05	1.46E-03	22.199	299.782	332.933	328.2095
300	1000	6.57E-05	1.62E-03	24.591	299.101	333.614	330.4166



$$K_a [\text{M}^{-1}] = 10089 \pm 11\%$$

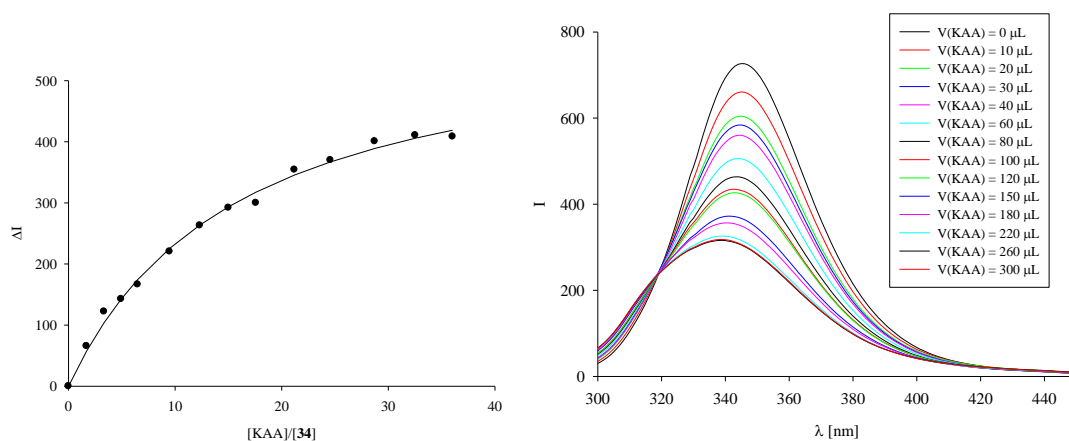


$$\Delta I_{\text{max}} = 351$$

Fluoreszenztitration von der Carboxymethylphosphatpinzette 34 mit dem Peptid KAA in Phosphatpuffer (10 mM, pH 7.2)

$\lambda_{\text{exc}} = 285 \text{ nm}$	Rezeptor	Gast
	(34)	KAA
Menge [mg]:	0.158	0.710
Volumen [mL]:	8.00	0.80
Konzentration [mol/L]:	$2.56 \cdot 10^{-5}$	$2.46 \cdot 10^{-3}$

Gast	Rezeptor	[Rezeptor]	[Gast]	[Gast]/	F.I.	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
V (μL)	V (μL)	[mol/L]	[mol/L]	[Rezeptor]	(I_{346})		
0	700	2.56E-05	0.0000	0.0000	726.605	0.0000	0.0000
10	710	2.56E-05	4.34E-05	1.6915	660.889	65.7160	57.3689
20	720	2.56E-05	8.55E-05	3.3361	604.497	122.1080	103.8966
30	730	2.56E-05	1.26E-04	4.9356	583.981	142.6240	142.3120
40	740	2.56E-05	1.66E-04	6.4918	560.139	166.4660	174.5208
60	760	2.56E-05	2.43E-04	9.4815	506.218	220.3870	225.4086
80	780	2.56E-05	3.16E-04	12.3178	463.568	263.0370	263.7224
100	800	2.56E-05	3.85E-04	15.0123	434.591	292.0140	293.5671
120	820	2.56E-05	4.50E-04	17.5754	426.588	300.0170	317.4499
150	850	2.56E-05	5.43E-04	21.1939	372.246	354.3590	345.4727
180	880	2.56E-05	6.30E-04	24.5657	356.656	369.9490	367.0045
220	920	2.56E-05	7.36E-04	28.7193	325.938	400.6670	388.9806
260	960	2.56E-05	8.34E-04	32.5267	315.977	410.6280	405.7554
300	1000	2.56E-05	9.23E-04	36.0296	318.084	408.5210	418.9761



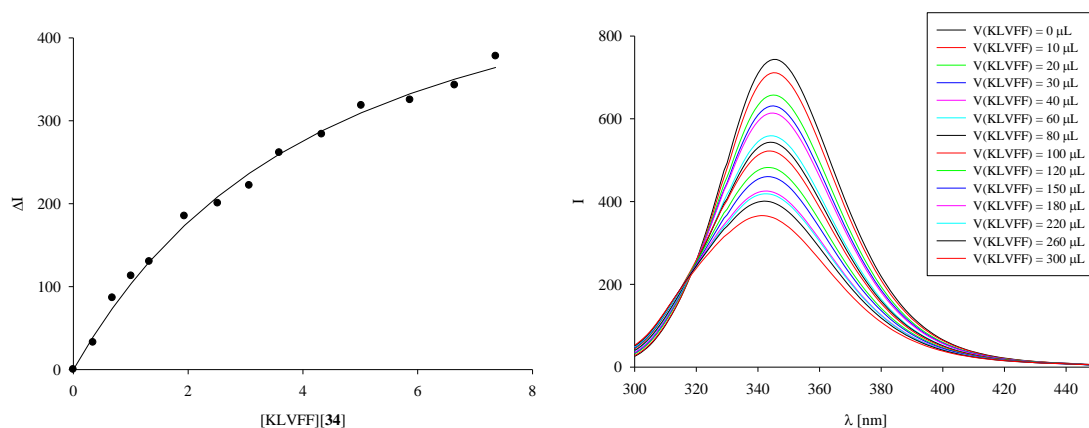
$$K_a [\text{M}^{-1}] = 2600 \pm 8\%$$

$$\Delta I_{\text{max}} = 597$$

Fluoreszenztitration von der Carboxymethylphosphatpinzette 34 mit dem Peptid KLVFF in Phosphatpuffer (10 mM, pH 7.2)

$\lambda_{\text{exc}} = 285 \text{ nm}$	Rezeptor	Gast
	(34)	KLVFF
Menge [mg]:	0.138	1.10
Volumen [mL]:	2.00	0.80
Konzentration [mol/L]:	$8.95 \cdot 10^{-5}$	$2.197 \cdot 10^{-3}$

Gast	Rezeptor	[Rezeptor]	[Gast]	[Gast]/	F.I.	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
V (μL)	V (μL)	[mol/L]	[mol/L]	[Rezeptor]	(I_{346})		
0	700	8.95E-05	0.00E+00	0.0000	743.936	0.000	0.0000
10	710	8.95E-05	3.09E-05	0.3456	711.416	32.520	39.5639
20	720	8.95E-05	6.10E-05	0.6816	657.488	86.448	73.8875
30	730	8.95E-05	9.03E-05	1.0084	631.143	112.793	103.8305
40	740	8.95E-05	1.19E-04	1.3264	613.861	130.075	130.0995
60	760	8.95E-05	1.73E-04	1.9373	558.976	184.960	173.8282
80	780	8.95E-05	2.25E-04	2.5168	543.451	200.485	208.5726
100	800	8.95E-05	2.75E-04	3.0674	522.089	221.847	236.7121
120	820	8.95E-05	3.22E-04	3.5911	482.489	261.447	259.8927
150	850	8.95E-05	3.88E-04	4.3304	460.294	283.642	287.8144
180	880	8.95E-05	4.49E-04	5.0193	425.533	318.403	309.7726
220	920	8.95E-05	5.25E-04	5.8680	418.812	325.124	332.6065
260	960	8.95E-05	5.95E-04	6.6459	401.022	342.914	350.3029
300	1000	8.95E-05	6.59E-04	7.3617	366.104	377.832	364.4007



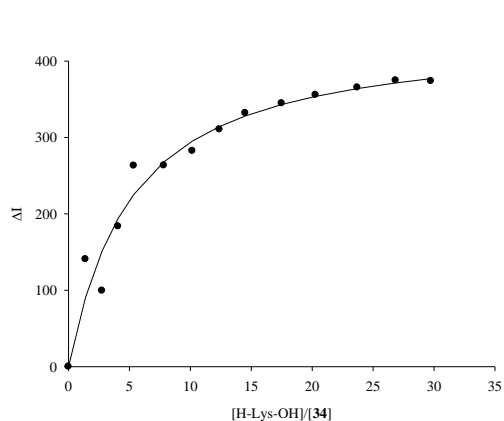
$$K_a [\text{M}^{-1}] = 3077 \pm 12\%$$

$$\Delta I_{\text{max}} = 561$$

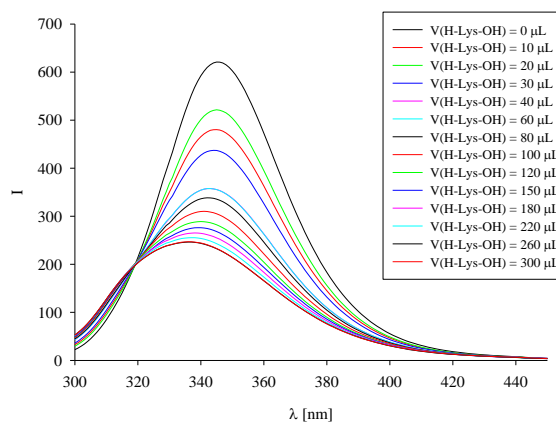
Fluoreszenztitration von der Carboxymethylphosphatpinzette 34 mit H-Lys-OH in Phosphatpuffer (10 mM, pH 7.2)

$\lambda_{\text{exc}} = 285 \text{ nm}$	Rezeptor	Gast
$\lambda_{\text{em}} = 342 \text{ nm}$	(34)	H-Lys-OH · HCl
Menge [mg]:	0.405	0.952
Volumen [mL]:	8.00	0.80
Konzentration [mol/L]:	$6.57 \cdot 10^{-5}$	$6.51 \cdot 10^{-3}$

Gast	Rezeptor	[Rezeptor]	[Gast]	[Gast]/	F.I.	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
V (μL)	V (μL)	[mol/L]	[mol/L]	[Rezeptor]	(I_{345})		
0	700	6.57E-05	0.00E+00	0.000	620.844	0.000	0.0000
10	710	6.57E-05	9.17E-05	1.397	480.285	140.559	90.6720
20	720	6.57E-05	1.81E-04	2.754	521.405	99.439	151.3640
30	730	6.57E-05	2.68E-04	4.075	437.187	183.657	194.0376
40	740	6.57E-05	3.52E-04	5.359	357.719	263.125	225.3693
60	760	6.57E-05	5.14E-04	7.828	357.514	263.330	267.9143
80	780	6.57E-05	6.68E-04	10.169	338.439	282.405	295.2500
100	800	6.57E-05	8.14E-04	12.394	310.275	310.569	314.2096
120	820	6.57E-05	9.53E-04	14.510	288.897	331.947	328.1010
150	850	6.57E-05	1.15E-03	17.497	276.157	344.687	343.1146
180	880	6.57E-05	1.33E-03	20.281	265.144	355.700	353.8040
220	920	6.57E-05	1.56E-03	23.710	255.391	365.453	364.0299
260	960	6.57E-05	1.76E-03	26.853	246.204	374.640	371.4088
300	1000	6.57E-05	1.95E-03	29.746	247.003	373.841	376.9824



$$K_a [\text{M}^{-1}] = 3362 \pm 19\%$$

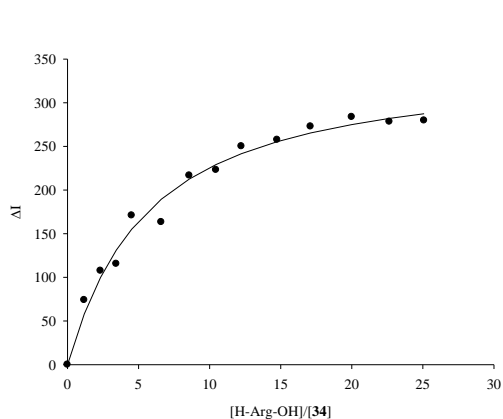


$$\Delta I_{\text{max}} = 436$$

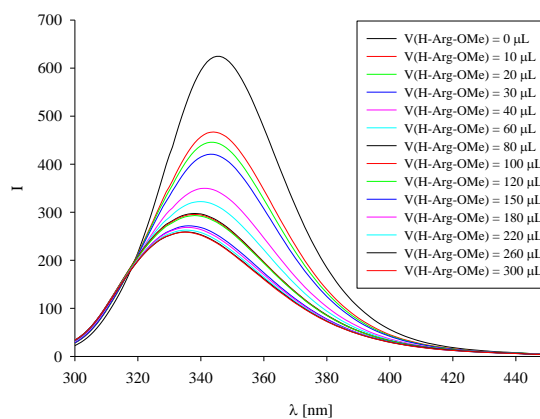
Fluoreszenztitration von der Carboxymethylphosphatpinzette 34 mit H-Arg-OH in Phosphatpuffer (10 mM, pH 7.2)

$\lambda_{\text{exc}} = 285 \text{ nm}$	Rezeptor	Gast
$\lambda_{\text{em}} = 342 \text{ nm}$	(34)	H-Arg-OH · HCl
Menge [mg]:	0.405	0.926
Volumen [mL]:	8.00	0.80
Konzentration [mol/L]:	$6.57 \cdot 10^{-5}$	$5.49 \cdot 10^{-3}$

Gast	Rezeptor	[Rezeptor]	[Gast]	[Gast]/	F.I.	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
V (μL)	V (μL)	[mol/L]	[mol/L]	[Rezeptor]	(I_{345})		
0	700	6.57E-05	0.00E+00	0.00	621.754	0.000	0.0000
10	710	6.57E-05	7.74E-05	1.178	547.777	73.977	58.0435
20	720	6.57E-05	1.53E-04	2.323	514.180	107.574	99.9385
30	730	6.57E-05	2.26E-04	3.437	506.336	115.418	131.2058
40	740	6.57E-05	2.97E-04	4.520	450.877	170.877	155.2541
60	760	6.57E-05	4.34E-04	6.602	458.538	163.216	189.5573
80	780	6.57E-05	5.63E-04	8.577	405.151	216.603	212.6863
100	800	6.57E-05	6.87E-04	10.453	398.784	222.970	229.2615
120	820	6.57E-05	8.04E-04	12.238	371.640	250.114	241.6933
150	850	6.57E-05	9.69E-04	14.758	364.221	257.533	255.4098
180	880	6.57E-05	1.12E-03	17.106	349.001	272.753	265.3563
220	920	6.57E-05	1.31E-03	19.998	338.100	283.654	275.0139
260	960	6.57E-05	1.49E-03	22.649	343.570	278.184	282.0700
300	1000	6.57E-05	1.65E-03	25.088	342.167	279.587	387.4485



$$K_a [\text{M}^{-1}] = 3025 \pm 13\%$$

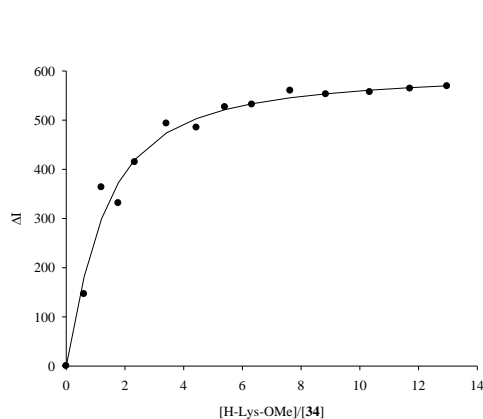


$$\Delta I_{\text{max}} = 347$$

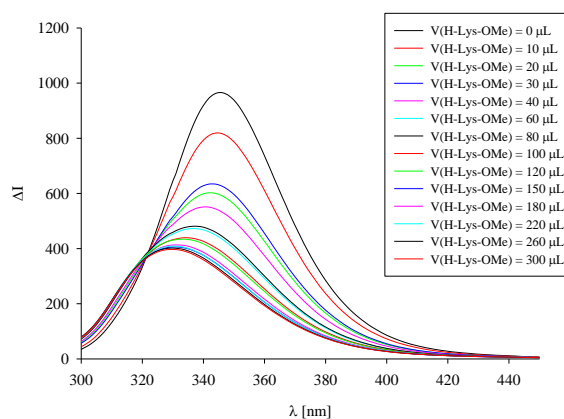
Fluoreszenztitration von der Carboxymethylphosphatpinzette 34 mit H-Lys-OMe · HCl in Phosphatpuffer (10m M, pH 7.2)

$\lambda_{\text{exc}} = 285 \text{ nm}$	Rezeptor	Gast
	(34)	H-Lys-OMe · HCl
Menge [mg]:	0.087	0.646
Volumen [mL]:	2.00	0.8
Konzentration [mol/L]:	$5.64 \cdot 10^{-5}$	$2.44 \cdot 10^{-3}$

Gast	Rezeptor	[Rezeptor]	[Gast]	[Gast]/	F.I.	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
V (μL)	V (μL)	[mol/L]	[mol/L]	[Rezeptor]	(I_{345})		
0	700	5.64E-05	0.0000	0.0000	965.8020	0.0000	0.0000
10	710	5.64E-05	3.44E-05	0.6091	819.4860	146.3160	181.3552
20	720	5.64E-05	6.78E-05	1.2012	602.4450	363.3570	299.0930
30	730	5.64E-05	1.00E-04	1.7772	634.6210	331.1810	372.7134
40	740	5.64E-05	1.32E-04	2.3375	551.3080	414.4940	419.9035
60	760	5.64E-05	1.93E-04	3.4140	472.7830	493.0190	474.0983
80	780	5.64E-05	2.50E-04	4.4353	481.0750	484.7270	503.2990
100	800	5.64E-05	3.05E-04	5.4056	439.3820	526.4200	521.2605
120	820	5.64E-05	3.57E-04	6.3285	434.1740	531.6280	533.3473
150	850	5.64E-05	4.31E-04	7.6314	405.8300	559.9720	545.4801
180	880	5.64E-05	4.99E-04	8.8455	413.3190	552.4830	553.5747
220	920	5.64E-05	5.84E-04	10.3411	408.8370	556.9650	560.9260
260	960	5.64E-05	6.61E-04	11.7121	401.8520	563.9500	566.0063
300	1000	5.64E-05	7.32E-04	12.9734	396.8240	568.9780	569.7252



$$K_a [\text{M}^{-1}] = 24637 \pm 17\%$$

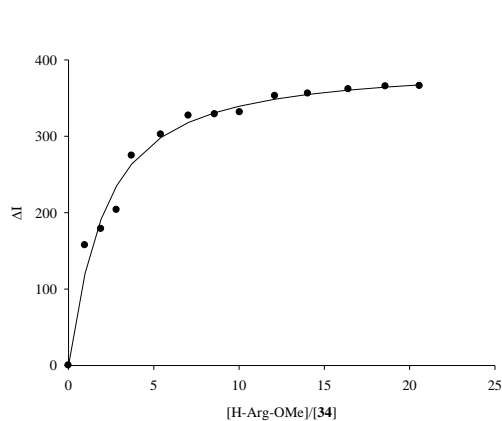


$$\Delta I_{\text{max}} = 604$$

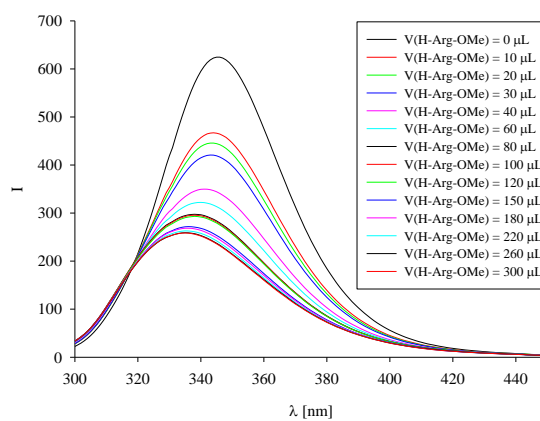
Fluoreszenztitration von der Carboxymethylphosphatpinzette 34 mit H-Arg-OMe · HCl in Phosphatpuffer (10m M, pH 7.2)

$\lambda_{\text{exc}} = 285 \text{ nm}$	Rezeptor	Gast
	(34)	H-Arg-OMe · HCl
Menge [mg]:	0.405	0.942
Volumen [mL]:	8.00	0.8
Konzentration [mol/L]:	$6.57 \cdot 10^{-5}$	$4.51 \cdot 10^{-3}$

Gast	Rezeptor	[Rezeptor]	[Gast]	[Gast]/	F.I.	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
V (μL)	V (μL)	[mol/L]	[mol/L]	[Rezeptor]	(I_{345})		
0	700	6.57E-05	0.00E+00	0.00	624.389	0.000	0.0000
10	710	6.57E-05	6.35E-05	0.967	467.043	157.346	120.1632
20	720	6.57E-05	1.25E-04	1.906	445.721	178.668	191.3206
30	730	6.57E-05	1.85E-04	2.820	420.821	203.568	235.1536
40	740	6.57E-05	2.44E-04	3.709	349.782	274.607	263.8995
60	760	6.57E-05	3.56E-04	5.418	322.109	302.280	298.4684
80	780	6.57E-05	4.62E-04	7.038	297.364	327.025	318.1812
100	800	6.57E-05	5.64E-04	8.578	295.565	328.824	330.8132
120	820	6.57E-05	6.60E-04	10.043	293.012	331.377	339.5677
150	850	6.57E-05	7.96E-04	12.110	271.677	352.712	348.5838
180	880	6.57E-05	9.22E-04	14.037	268.475	355.914	354.7366
220	920	6.57E-05	1.08E-03	16.706	262.802	361.587	360.4261
260	960	6.57E-05	1.22E-03	18.586	259.094	365.295	364.4172
300	1000	6.57E-05	1.35E-03	20.587	258.523	365.866	367.3706



$$K_a [\text{M}^{-1}] = 10011 \pm 14\%$$

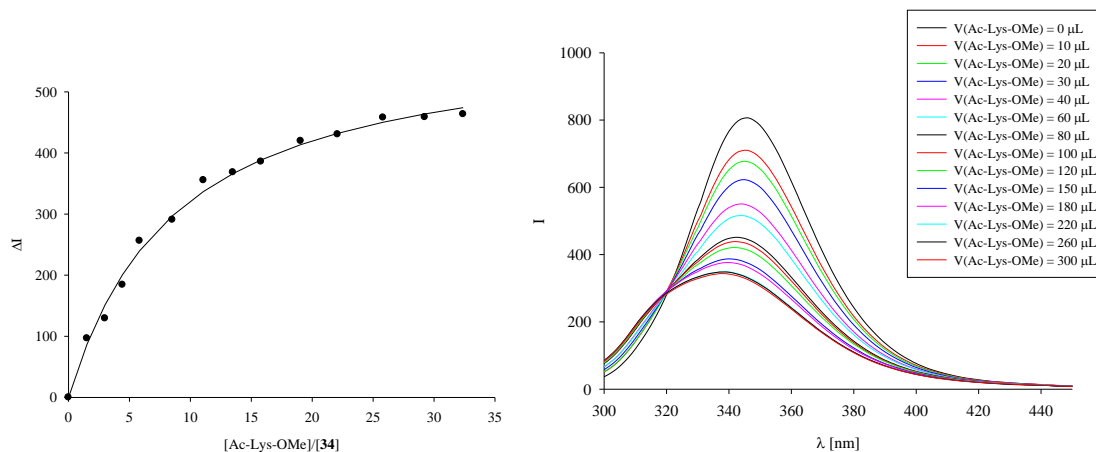


$$\Delta I_{\text{max}} = 396$$

Fluoreszenztitration der Carboxymethylphosphatpinzette 34 mit Ac-Lys-OMe·HCl in Zitronensäure-Phosphatpuffer (10m M, pH 4.0)

$\lambda_{\text{exc}} = 285 \text{ nm}$	Rezeptor	Gast
	(34)	Ac-Lys-OMe · HCl
Menge [mg]:	0.111	0.495
Volumen [mL]:	6.00	0.8
Konzentration [mol/L]:	$2.40 \cdot 10^{-5}$	$2.59 \cdot 10^{-3}$

Gast	Rezeptor	[Rezeptor]	[Gast]	[Gast]/	F.I.	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
V (μL)	V (μL)	[mol/L]	[mol/L]	[Rezeptor]	(I_{345})		
0	700	2.40E-05	0.0000	0.0000	806.9290	0.0000	0.0000
10	710	2.40E-05	3.65E-05	1.5208	710.2970	96.6320	86.8500
20	720	2.40E-05	7.20E-05	2.9994	677.5980	129.3310	151.3731
30	730	2.40E-05	1.07E-04	4.4374	622.6480	184.2810	200.8564
40	740	2.40E-05	1.40E-04	5.8366	550.7520	256.1770	239.8450
60	760	2.40E-05	2.05E-04	8.5245	516.2150	290.7140	297.0981
80	780	2.40E-05	2.66E-04	11.0745	451.4790	355.4500	336.9441
100	800	2.40E-05	3.24E-04	13.4971	438.6240	368.3050	366.1890
120	820	2.40E-05	3.79E-04	15.8015	421.1090	385.8200	388.5311
150	850	2.40E-05	4.57E-04	19.0547	387.2480	419.6810	413.6127
180	880	2.40E-05	5.30E-04	22.0861	376.3970	430.5320	432.0968
220	920	2.40E-05	6.20E-04	25.8205	348.9920	457.9370	450.2933
260	960	2.40E-05	7.02E-04	29.2437	348.3100	458.6190	463.7486
300	1000	2.40E-05	7.78E-04	32.3930	343.4990	463.4300	474.0985



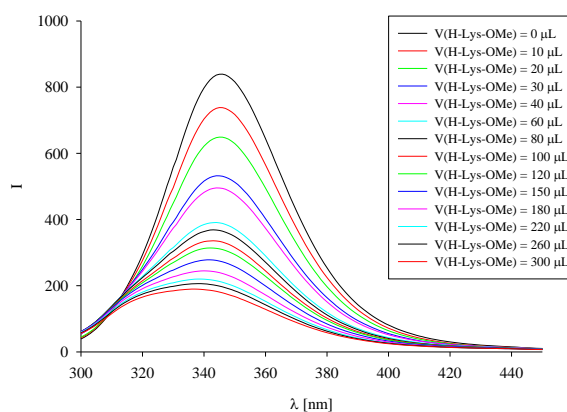
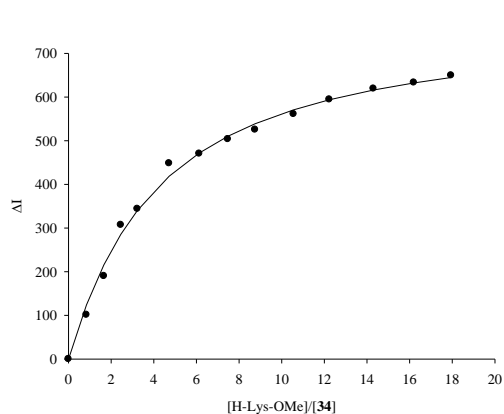
$$K_a [\text{M}^{-1}] = 5182 \pm 8\%$$

$$\Delta I_{\text{max}} = 595$$

Fluoreszenztitration der Carboxymethylphosphatpinzette 34 mit H-Lys-OMe·HCl in Zitronensäure-Phosphatpuffer (10m M, pH 4.0)

$\lambda_{\text{exc}} = 285 \text{ nm}$	Rezeptor	Gast
	(34)	H-Lys-OMe · HCl
Menge [mg]:	0.111	0.380
Volumen [mL]:	6.00	0.8
Konzentration [mol/L]:	$2.40 \cdot 10^{-5}$	$1.44 \cdot 10^{-3}$

Gast	Rezeptor	[Rezeptor]	[Gast]	[Gast]/	F.I.	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
V (μL)	V (μL)	[mol/L]	[mol/L]	[Rezeptor]	(I_{345})		
0	700	2.40E-05	0.0000	0.0000	839.2670	0.0000	0.0000
10	710	2.40E-05	2.02E-05	0.8424	738.0800	101.1870	123.9390
20	720	2.40E-05	3.99E-05	1.6615	649.0980	190.1690	215.9263
30	730	2.40E-05	5.90E-05	2.4581	532.1560	307.1110	285.8386
40	740	2.40E-05	7.76E-05	3.2332	495.4290	343.8380	340.2512
60	760	2.40E-05	1.13E-04	4.7221	391.0670	448.2000	418.6570
80	780	2.40E-05	1.47E-04	6.1347	368.8610	470.4060	471.9158
100	800	2.40E-05	1.79E-04	7.4767	335.8440	503.4230	510.2106
120	820	2.40E-05	2.10E-04	8.7532	314.0930	525.1740	538.9740
150	850	2.40E-05	2.53E-04	10.5554	278.1860	561.0810	570.7264
180	880	2.40E-05	2.94E-04	12.2346	244.7870	594.4800	593.7482
220	920	2.40E-05	3.43E-04	14.3033	220.0190	619.2480	616.0885
260	960	2.40E-05	3.89E-04	16.1995	206.1370	633.1300	632.3974
300	1000	2.40E-05	4.31E-04	17.9441	189.8170	649.4500	644.8188



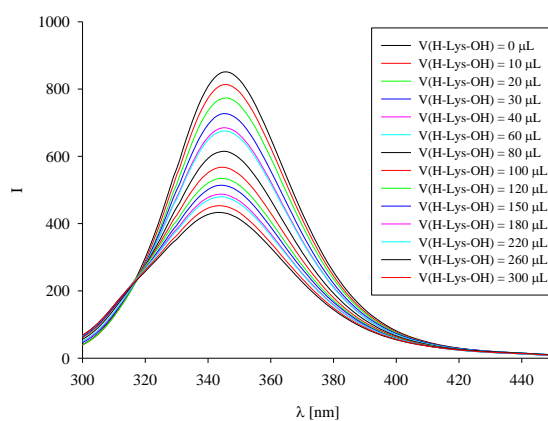
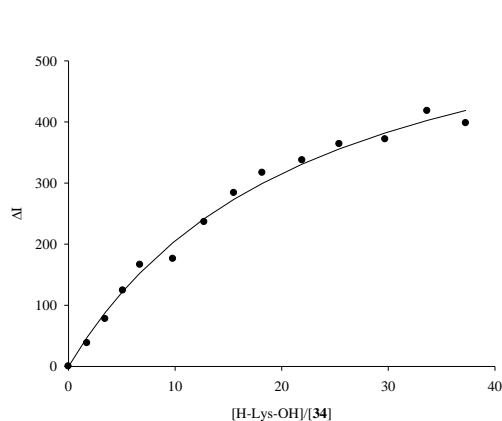
$$K_a [\text{M}^{-1}] = 11482 \pm 8\%$$

$$\Delta I_{\text{max}} = 781$$

Fluoreszenztitration der Carboxymethylphosphatpinzette 34 mit H-Lys-OH in Zitronensäure-Phosphatpuffer (10m M, pH 4.0)

$\lambda_{\text{exc}} = 285 \text{ nm}$	Rezeptor	Gast
	(34)	H Lys OH
Menge [mg]:	0.111	0.436
Volumen [mL]:	6.00	0.8
Konzentration [mol/L]:	$2.40 \cdot 10^{-5}$	$2.98 \cdot 10^{-3}$

Gast	Rezeptor	[Rezeptor]	[Gast]	[Gast]/	F.I.	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
V (μL)	V (μL)	[mol/L]	[mol/L]	[Rezeptor]	(I_{345})		
0	700	2.40E-05	0.0000	0.0000	851.2250	0.0000	0.0000
10	710	2.40E-05	4.20E-05	1.7502	813.2530	37.9720	47.7204
20	720	2.40E-05	8.29E-05	3.4518	773.7240	77.5010	88.2108
30	730	2.40E-05	1.26E-04	5.1067	727.0960	124.1290	122.9680
40	740	2.40E-05	1.61E-04	6.7169	685.0990	166.1260	153.1093
60	760	2.40E-05	2.36E-04	9.8103	675.3750	175.8500	202.7473
80	780	2.40E-05	3.06E-04	12.7450	615.1200	236.1050	241.8889
100	800	2.40E-05	3.73E-04	15.5329	567.5450	283.6800	273.5186
120	820	2.40E-05	4.37E-04	18.1849	534.4250	316.8000	299.5951
150	850	2.40E-05	5.26E-04	21.9288	513.9870	337.2380	331.1085
180	880	2.40E-05	6.10E-04	25.4175	487.5300	363.6950	356.0286
220	920	2.40E-05	7.13E-04	29.7152	479.6840	371.5410	382.1269
260	960	2.40E-05	8.08E-04	33.6547	433.2550	417.9700	402.5180
300	1000	2.40E-05	8.95E-04	37.2790	453.2060	398.0190	418.8858



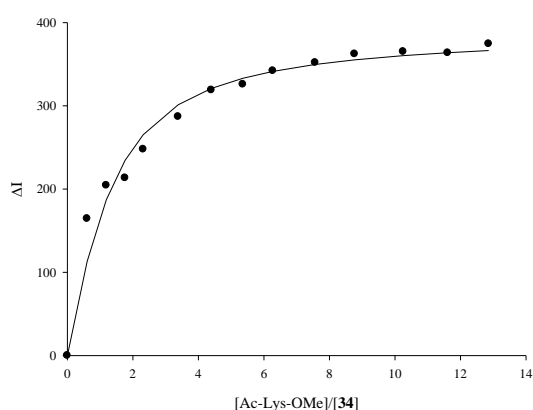
$$K_a [\text{M}^{-1}] = 1908 \pm 13\%$$

$$\Delta I_{\text{max}} = 668$$

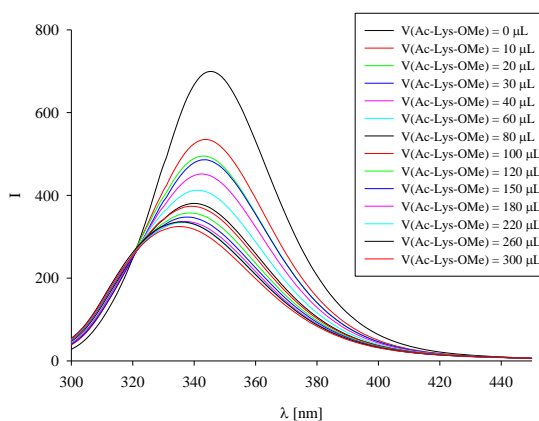
Fluoreszenztitration von der Carboxymethylphosphatpinzette 34 mit Ac-Lys-OMe · HCl in Phosphatpuffer (10 mM, pH 7.2) mit 150 mM NaCl

$\lambda_{\text{exc}} = 285 \text{ nm}$	Rezeptor	Gast
	(34)	Ac-Lys-OMe · HCl
Menge [mg]:	0.491	0.652
Volumen [mL]:	8.00	0.800
Konzentration [mol/L]:	$7.96 \cdot 10^{-5}$	$3.41 \cdot 10^{-3}$

Gast	Rezeptor	[Rezeptor]	[Gast]	[Gast]/	F.I.	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
V (μL)	V (μL)	[mol/L]	[mol/L]	[Rezeptor]	(I_{346})		
0	700	7.96E-05	0.00E+00	0	699.367	0.000	0.0000
10	710	7.96E-05	4.81E-05	0.6038	534.925	164.442	113.0415
20	720	7.96E-05	9.48E-05	1.1908	495.017	204.350	187.2819
30	730	7.96E-05	1.40E-04	1.7618	486.098	213.269	234.5363
40	740	7.96E-05	1.85E-04	2.3173	451.644	247.723	265.3292
60	760	7.96E-05	2.70E-04	3.3845	412.456	286.911	301.2827
80	780	7.96E-05	3.50E-04	4.3969	380.535	318.832	320.9373
100	800	7.96E-05	4.27E-04	5.3587	373.648	325.719	333.1262
120	820	7.96E-05	5.00E-04	6.2736	357.305	342.062	341.3702
150	850	7.96E-05	6.03E-04	7.5653	347.502	351.865	349.6783
180	880	7.96E-05	6.98E-04	8.7688	337.095	362.272	355.2390
220	920	7.96E-05	8.16E-04	10.2515	334.260	365.107	360.3010
260	960	7.96E-05	9.25E-04	11.6106	335.757	363.610	363.8057
300	1000	7.96E-05	1.02E-03	12.8610	324.897	374.470	366.3744



$$K_a [\text{M}^{-1}] = 16322 \pm 19\%$$

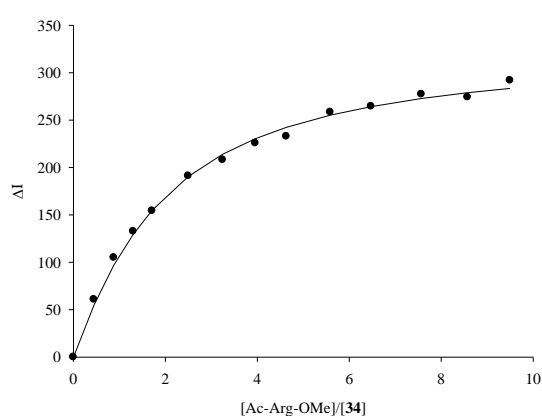


$$\Delta I_{\text{max}} = 390$$

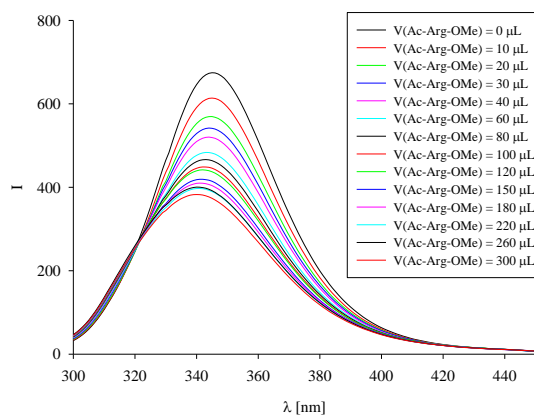
Fluoreszenztitration von der Carboxymethylphosphatpinzette **34 mit Ac-ArgO-Me · HCl in Phosphatpuffer (10m M, pH 7.2) mit 150 mM NaCl**

$\lambda_{\text{exc}} = 285 \text{ nm}$	Rezeptor	Gast
	(34)	Ac-Arg-OMe · HCl
Menge [mg]:	0.491	0.538
Volumen [mL]:	8.00	0.8
Konzentration [mol/L]:	$7.96 \cdot 10^{-5}$	$2.52 \cdot 10^{-3}$

Gast	Rezeptor	[Rezeptor]	[Gast]	[Gast]/	F.I.	ΔI_{obs}	ΔI_{calc}
V (μL)	V (μL)	[mol/L]	[mol/L]	[Rezeptor]	(I_{345})		
0	700	7.96E-05	0.00E+00	0	674.551	0.000	0.0000
10	710	7.96E-05	3.55E-05	0.4459	613.797	60.754	54.8186
20	720	7.96E-05	7.00E-05	0.8794	569.556	104.995	97.0567
30	730	7.96E-05	1.04E-04	1.3010	541.915	132.636	129.5730
40	740	7.96E-05	1.36E-04	1.7113	520.269	154.282	154.8157
60	760	7.96E-05	1.99E-04	2.4993	483.446	191.105	190.5502
80	780	7.96E-05	2.59E-04	3.2470	466.432	208.119	214.0497
100	800	7.96E-05	3.15E-04	3.9573	448.834	225.717	230.4148
120	820	7.96E-05	3.69E-04	4.6329	441.804	232.747	242.3667
150	850	7.96E-05	4.45E-04	5.5867	416.177	258.374	255.1907
180	880	7.96E-05	5.16E-04	6.4755	410.008	264.543	264.2324
220	920	7.96E-05	6.03E-04	7.5704	397.272	277.279	272.7929
260	960	7.96E-05	6.83E-04	8.5741	400.371	274.180	278.9068
300	1000	7.96E-05	7.56E-04	9.4975	382.713	291.838	283.4859



$$K_a [\text{M}^{-1}] = 8968 \pm 7\%$$

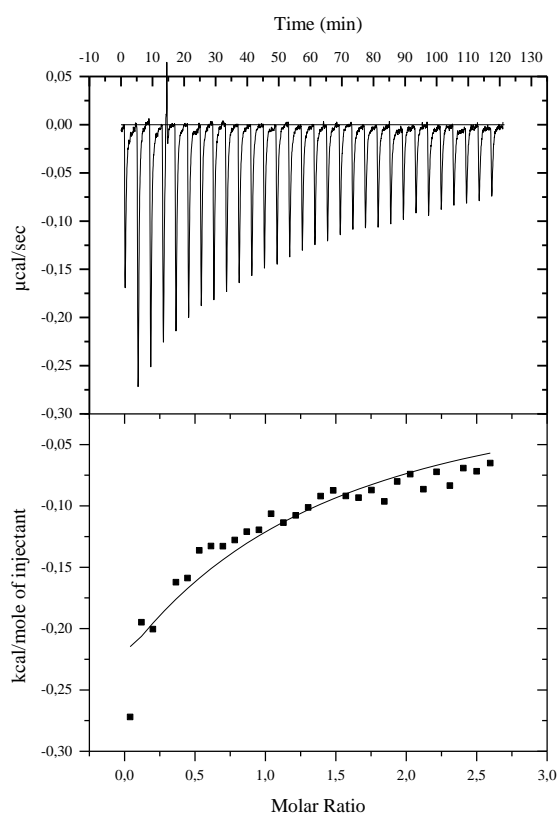


$$\Delta I_{\text{max}} = 329$$

5.4.3 Bestimmung der Assoziationskonstanten mittels Isothermer Mikrokalorimetrie (ITC)

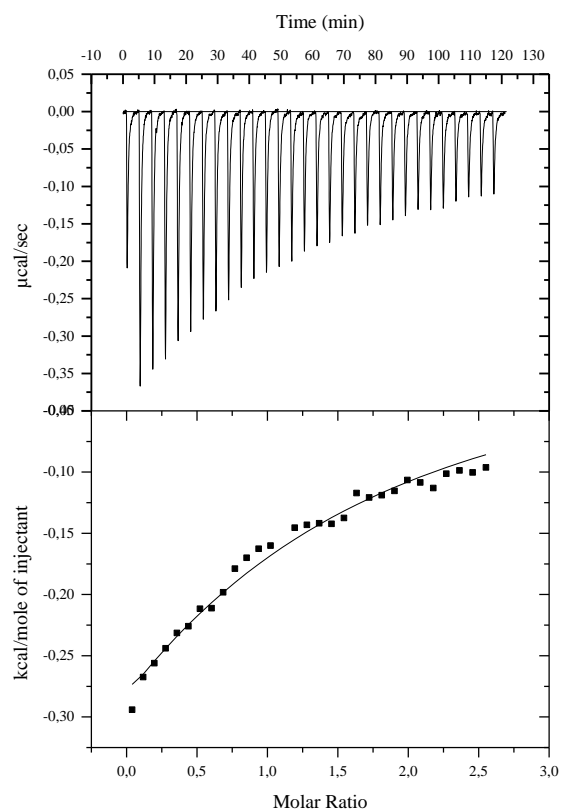
ITC Titration der Carboxymethylpinzette **24** (0.458 mmol) mit Ac-Lys-OMe (5.19 mmol) in 20 mM Phosphatpuffer *pH* 7.72

K_a [M^{-1}]	n	ΔH [kcal/mol]	$-T\Delta S$ [kcal/mol]	ΔG [kcal/mol]
722 ± 680	0.373 ± 1.6	-1.985 ± 9.09	-1.914	-3.899



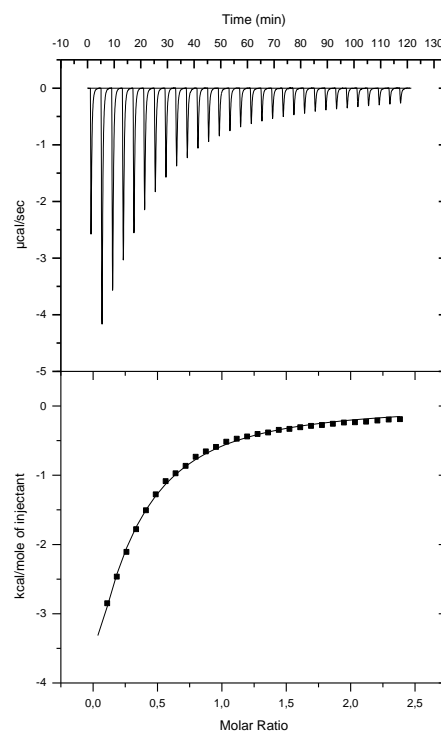
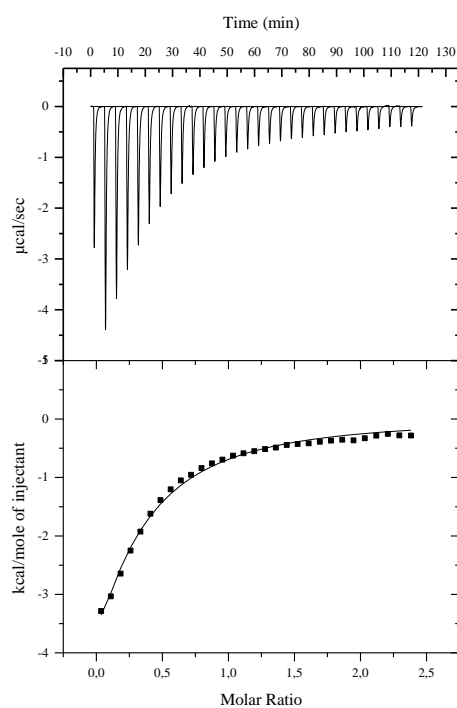
ITC Titration der Carboxymethylpinzette **24** (0.458 mmol) mit Ac-Arg-OMe (5.10 mmol) in 20 mM Phosphatpuffer pH 7.72

K_a [M^{-1}]	n	ΔH [kcal/mol]	$-T\Delta S$ [kcal/mol]	ΔG [kcal/mol]
776 ± 310	0.974 ± 0.52	-1.074 ± 0.750	-2.869	-3.943



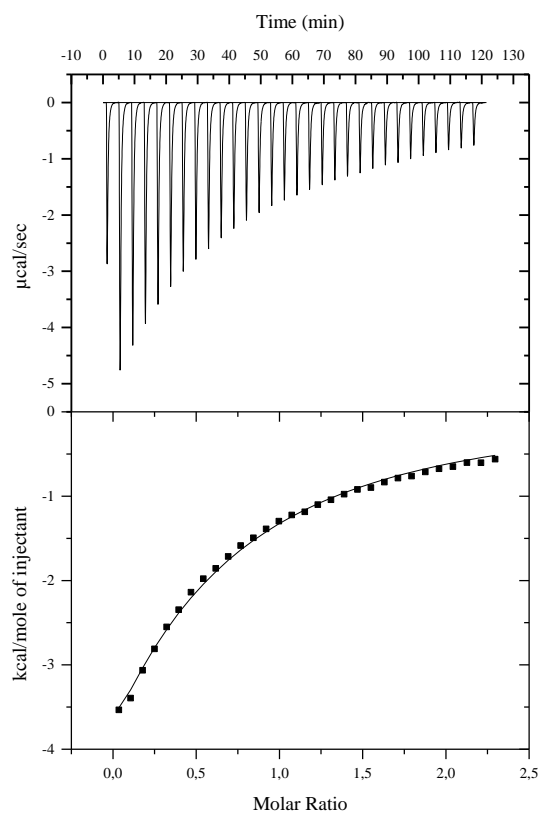
ITC Titration der Carboxymethylphosphatpinzette **34** (0.499 mmol) mit Ac-Lys-OMe (5.19 mmol) in 20 mM Phosphatpuffer pH 7.72

$K_a [M^{-1}]$	n	$\Delta H [kcal/mol]$	$-T\Delta S [kcal/mol]$	$\Delta G [kcal/mol]$
3090 ± 350	0.147 ± 0.056	-18.89 ± 7.68	14.133	-4.757
3580 ± 240	0.128 ± 0.034	-18.67 ± 5.22	13.805	-4.865



ITC Titration der Carboxymethylphosphatpinzette **34** (0.499 mmol) mit Ac-Arg-OMe (5.10 mmol) in 20 mM Phosphatpuffer pH 7.72

$K_a [M^{-1}]$	n	$\Delta H [kcal/mol]$	$-T\Delta S [kcal/mol]$	$\Delta G [kcal/mol]$
1580 ± 150	0.301 ± 0.077	-18.69 ± 5.29	14.313	-4.377



6. Literaturverzeichnis

- 1 J. M. Lehn, *Supramolecular Chemistry, Concepts and Perspectives*, VCH, Weinheim, **1995**.
- 2 J. W. Steed, J. L. Atwood, *Supramolecular Chemistry*, 2. Ed., Wiley&Sons, **2009**.
- 3 K. Gloe, K. Gloe, H. Heßke, L. F. Lindoy, *Wiss. Z. TU Dresden*, **2007**, 56, Heft 1-2.
- 4 C. J. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, 2496, 7017.
- 5 C. J. Pedersen, *Angew. Chem.* **1988**, 100, 1053.
- 6 C. J. Pedersen, H. K. Frensdorff, *Angew. Chem.* **1972**, 84, 16.
- 7 J. M. Lehn, *Pure Appl. Chem.* **1978**, 50, 871.
- 8 J. M. Lehn, *Science* **1985**, 18, 849.
- 9 R. Breslow, *Isr. J. Chem.* **1979**, 18, 849.
- 10 F. Diederich, *Cyclophanes*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1991**.
- 11 S. M. Ngola, P. C. Kearney, S. Mecozzi, K. Russel, D. A. Dougherty, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 1192.
- 12 D. Philip, J. F. Stoddart, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 1155.
- 13 M. V. Rekharsky, Y. Inoue, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1875.
- 14 F. Venema, C. M. Baselier, M. C. Feiters, R. J. M. Nolte, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 8661.
- 15 A. Collet, J. P. Dutasta, B. Lozach, J. Canceill, *Top. Curr. Chem.* **1993**, 165, 103.
- 16 E. Fischer, *Chem. Ber.* **1984**, 27, 2985.
- 17 E. A. Meyer, R. K. Castellano, F. Diederich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 1210.
- 18 Y. L. Cho, D. M. Rudkevich, A. Shivanyuk, K. Rissanen, J. Rebek, *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 3788.
- 19 M. M. Conn, G. Deslongchamps, J. Demendoza, J. Rebek, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 3548.
- 20 G. A. Jeffrey, W. Saenger, *Hydrogen Bondings In Biological Structures*, Springer, Berlin, **1991**.
- 21 G. A. Jeffrey, *An Introduction of Hydrogen Bonding*, Oxford University Press, New York, **1997**.
- 22 L. J. Prins, D. N. Reinhoudt, P. Timmerman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2383.
- 23 C. A. Hunter, K. R. Lawson, J. Perkins, C. J. Urch, *J. Chem. Soc.* **2001**, 651.
- 24 E. Kim, S. Paliwal, C. S. Wilcox, *J. Am. Soc.* **1998**, 120, 11192.
- 25 K. Nakamura, K. N. Houk, *Org. Lett.* **1999**, 1, 2049.

- 26 M. O. Sinnokrot, E. F. Valeev, C. D. Sherill, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10887.
- 27 J. C. Ma, D. A. Dougherty, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1303.
- 28 J. Sunner, K. Nishizawa, P. Kebarle, *J. Phys. Chem.* **1981**, *85*, 1814.
- 29 H.-D. Höltje, W. Sippl, D. Rogan, G. Folkers, *Molecular Modeling: Basic Approach*, Oxford University Press, New York, **2005**.
- 30 R. E. Babine, S. S. Abdel-Meguid, *Protein Crystallography in Drug Discovery*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **2004**.
- 31 M. Kopitz, K. Eis, *Drug Discov. Today* **2006**, *11*, 561.
- 32 G. Scapin, *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *11*, 561.
- 33 A. H. Katz, C. E. Caufield, *Curr. Pharm. Des.* **2003**, *9*, 857.
- 34 C.-W. Chen, H. W. Whitlock jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 4921.
- 35 S. C. Zimmerman, C. M. VanZyl, *J. Am. Chem.* **1987**, *109*, 7894.
- 36 S. C. Zimmerman, C. M. VanZyl, G. S. Hamilton, *J. Am. Chem.* **1989**, *111*, 1373.
- 37 S. C. Zimmerman, *Bioorganic Chem. Frontiers* **1991**, *175*, 25.
- 38 S. C. Zimmerman, *Top. Curr. Chem.* **1993**, *165*, 71.
- 39 J. Benkhoff, *Dissertation*, Universität Essen, **1994**.
- 40 F.-G. Klärner, J. Benkhoff, R. Boese, U. Burkert, M. Kamieth, U. Naatz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 1130.
- 41 M. Kamieth, *Dissertation*, Universität Essen, **1998**.
- 42 F.-G. Klärner, U. Burkert, M. Kamieth, R. Boese, J. Benet-Buchholz, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1700.
- 43 U. Burkert, *Dissertation*, Universität Essen, **1999**.
- 44 F.-G. Klärner, J. Panitzky, D. Bläser, D. Preda, L. T. Scott, *J. Mol. Model.* **2000**, *6*, 318.
- 45 M. Kamieth, F.-G. Klärner, F. Diederich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3303.
- 46 J. Panitzky, *Dissertation*, Universität Essen, **2001**.
- 47 F.-G. Klärner, J. Panitzky, D. Bläser, R. Boese, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 3673.
- 48 F.-G. Klärner, J. Polkowksa, J. Panitzky, U. P. Seelbach, U. Burkert, M. Kamieth, R. Boese, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 1405.
- 49 F.-G. Klärner, C. Jasper, T. Schrader, J. Panitzky, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1411.
- 50 M. Fokkens, C. Jasper, T. Schrader, F. Koziol, C. Ochsenfeld, J. Polkowska, F.-G. Klärner, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 477.
- 51 M. Fokkens, *Dissertation*, Universität Marburg, **2005**.
- 52 M. Fokkens, T. Schrader, F.-G. Klärner, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 144415.

-
- 53 T. Schrader, M. Fokkens, F.-G. Klärner, J. Polkowska, F. Bastkowski, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10227.
- 54 F. Bastkowski, *Dissertation*, Universität Duisburg-Essen, **2008**.
- 55 P. Talbiersky, F. Bastkowski, F.-G. Klärner, T. Schrader, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9824.
- 56 P. Talbiersky, *Dissertation*, Universität Duisburg-Essen, **2009**.
- 57 J.-C. Amé, C. Spenlehauer, G. de Murcia, *BioEssays* **2004**, *26*, 882.
- 58 Z. Herzeg, Z.-Q. Wang, *Mutation Research* **2001**, *477*, 97.
- 59 D. D'Amours, S. Desnoyers, I. D'Silva, G. Poirier, *Biochem. J.* **1999**, *342*, 249.
- 60 S. Petrucco, R. Percudani, *FEBS Journal* **2008**, *275*, 883.
- 61 O. Mortusewicz, J.-C. Amé, V. Schreiber, H. Leonhardt, *Nucleic Acids Research* **2007**, *1*.
- 62 Z. Tao, P. Gao, D. W. Hoffman, H.-W. Liu, *Biochemistry* **2008**, *47*, 5804.
- 63 G. Gradwohl, J. M. de Murcia, M. Molinete, F. Simonin, M. Koken, J. H. J. Hoemakers, G. de Murcia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 2990.
- 64 V. Cepeda, M. A. Fuertes, J. Castilla, C. Alonso, C. Quevedo, M. Soto, J. M. Pérez, *Recent Patents an Anti-Cancer Drug Discovery* **2006**, *1*, 39.
- 65 V. Schreiber, M. Molinete, H. Boeuf, G. de Murcia, J. Menissier-de Murcia, *EMBO Journal* **1992**, *11*, 3263.
- 66 M. Ikejima, S. Noguchi, R. Yamadhita, T. Ogura, T. Suginura, M. D. Gill, M. Miwa, *J. Biol. Chem.* **1990**, *35*, 21907.
- 67 H. Mendoza-Alvarez, R. Alvarez-Gonzales, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 22575.
- 68 T. Kinoshita, I. Nakanishi, M. Warizaya, A. Iwashita, Y. Kido, K. Hattori, T. Fujii, *FEBS Letters* **2004**, *556*, 34.
- 69 A. Ruf, V. Rolli, G. de Murcia, G. E. Schulz, *J. Mol. Biol.* **1998**, *278*, 57.
- 70 W. Ying, C. C. Alano, P. Garnier, R. A. Swanson, *Journal of Neuroscience Research* **2005**, *79*, 216.
- 71 A. Chiarugi, M. A. Moskowitz, *Science* **2002**, *297*, 200.
- 72 Q. Huang, H. M. Shen, *Autophagy* **2009**, *5*, 273.
- 73 T. Eltze, R. Boer, T. Wagner, S. Einbrenner, M. C. McDonald, C. Thiemermann, A. Bürkle, T. Klein, *Mol. Pharmacol.* **2008**, *74*, 1587.
- 74 P. I. Bauer, J. Mendeleyeva, E. Kirsten, J. A. Comstock, A. Hakam, K. G. Buhi, E. Kun, *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *63*, 445.
- 75 M. Fujita, M. Otsuka, Y. Singuira, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 503.

- 76 W. G. Rice, J. A. Turpin, M. Huang, D. Clantan, R. W. Buckheit jr., D. G. Covell, A. Wallquist, N. B. McDonnell, R. N. DeGuzman, M. F. Summers, L. Zalkow, J. P. Bader, R. D. Haugwitz, E. A. Sausville, *Nature Medicine* **1997**, 3, 341.
- 77 A. Iwashita, N. Tojo, S. Matsuura, S. Yamzaki, K. Kamijo, J. Ishida, H. Yamamoto, K. Hattori, N. Matsuoka, S. Mutoh, *JPET* **2004**, 310, 425.
- 78 F. Horn, G. Lindenmeier, I. Moc, C. Grillhösl, S. Berkhold, N. Schneider, B. Münster, *Biochemie des Menschen*, Thieme Verlag, Stuttgart, **2002**.
- 79 *Lexikon der Biochemie*, Spektrum Verlag, München, **2000**.
- 80 M. Kotaka, S. Gover, L. Vandeputte-Rutten, S. W. N. Au, V. M. S. Lam, M. J. Adams, *Acta Cryst.* **2005**, 61, 495.
- 81 H. R. Levy, *Biochem. Soc. Trans.* **1989**, 17, 313.
- 82 S. W. N. Au, S. Gover, V. M. S. Lam, M. J. Adams, *Structure* **2000**, 8, 293.
- 83 M. Kirsch, H. de Groot, *The FASEB Journal* **2001**, 15, 1569.
- 84 S. Filosa, A. Fico, F. Paglialunga, M. Balestrieri, A. Crooke, P. Abrescia, J. M. Bautista, G. Martini, *Biochem. J.* 2003, 370, 935.
- 85 C. R. Scriver, *The metabolic and molecular basis of inherited disease*, McGraw-Hill, Inc., New York, **1995**, 3367.
- 86 E. Beutler, *Hematology*, McGraw-Hill, Inc., New York, **1995**, 3367.
- 87 E. A. Zaitseva, E. S. Chukrai, O. M. Poltorak, *Vestnik Moskovskogo Universiteta Khimiya* **2000**, 41, 127.
- 88 X.-T. Wang, T. F. Chan, V. M. S. Lam, P. C. Engel, *Protein Sci.* **2008**, 17, 1403.
- 89 D. Thomas, H. Cherest, Y. Surdin-Kerjan, *The EMBO Journal* **1991**, 10, 547.
- 90 G. Gordon, M. C. Mackow, H. R. Levy, *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, 318, 25.
- 91 C. Farquharson, J. Milne, N. Loveridge, *Bone and mineral* **1993**, 22, 105.
- 92 G. W. Oertel, I. Rebelein, *Biochem. Biophys. Acta* **1969**, 184, 459.
- 93 M. Kirsch, P. Talbiersky, J. Polkowska, F. Bastkowski, T. Schaller, H. de Groot, F.-G. Klärner, T. Schrader, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 121, 2930.
- 94 M. Casas Catagena, *Dissertation*, Universität Duisburg-Essen **2007**.
- 95 S. Dutt, *Dissertation*, Universität Duisburg-Essen, **2012**.
- 96 H. J. Schneider, R. Kramer, S. Simova, U. Schneider, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 6442.
- 97 F.-G. Klärner, B. Kahlert, A. Nellesen, J. Zienau, C. Ochsenfeld, T. Schrader, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 4831.
- 98 K. A. Connors: *Binding Constants*, John-Wiley & Sons, New York **1987**.

- 99 K. Hirose, *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.* **2001**, 39, 193.
- 100 W. Hendrickson, *Biotechniques* **1985**, 3, 346.
- 101 A. Revzin, *Biotechniques* **1989**, 7, 346.
- 102 M. Fried, D. M. Crothers, *Nucleic Acids Res.* **1981**, 9, 6505.
- 103 M. M. Garner, A. Revzin, *Nucleic Acids Res.* **1981**, 9, 3047.
- 104 P. G. Stockley, *Filter-binding assays. From Methods in Molecular Biology*, Vol. 30: *DNA-Protein Interactions: Principles and Protocols*, G. Geoff Kneale, Ed., Humana Press Inc., Totowa, NJ. **1994**.
- 105 M. G. Fried, D. M. Crothers, *J. Mol. Biol.* **1984**, 172, 263.
- 106 M.G. Fried, *Electrophoresis* **1989**, 10, 366.
- 107 S. V. Allen, E. S. Miller, *Anal. Biochem.* **1999**, 269, 32.
- 108 Y. W. Park et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 6694.
- 109 M. E. Grunwald et al., *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 9148.
- 110 J. Bürck, *Strukturaufklärung von Biomolekülen*, Universität Karlsruhe, **2005**.
- 111 A. L. Creagh, J. M. Prausnitz, M. W. Blanch, *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, 41, 156.
- 112 G. Böhm, *ACGT ProGenomics AG*, Halle, **2005**.
- 113 S. M. Kelly, N. C. Price, *Biochem. Biophys. Acta* **1997**, 1338, 161.
- 114 M. Sreerama, R. W. Woody, *Anal. Biochem.* **1993**, 209, 32.
- 115 G. Snatzke, *Angew. Chem.* **1968**, 80, 15.
- 116 F. Snatzke, G. Snatzke, *Z. Anal. Chem.* **1977**, 285, 97.
- 117 G. Snatzke, *Circular Dichroism: Principles and Applications, Second Edition*, Wiley VCH, New York, **2000**.
- 118 H.-J. Schneider, A. Yatsimirsky, *Principles and Methods in Supramolecular Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- 119 P. J. Garratt, A. J. Ibbett, J. E. Ladbury, R. O'Brien, M. B. Hursthouse, K. M. A. Malik, *Tetrahedron* **1998**, 54, 949.
- 120 J. L. Atwood, J. E. D. Davies, D. D. MacNicol, F. Vögtle, K. S. Suslik, *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Elsevier, Oxford **1996**.
- 121 A. Thibblin, *J. Phys. Org. Chem.* **2002**, 15, 233.
- 122 V. Mandiyan, R. O'Brien, M. Zhou, B. Margolis, M. A. Lemmon, J. M. Sturtevant, J. Schlessinger, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 4770.
- 123 Y. L. Zhang, Z. Y. Zhang, *Annal. Biochem.* **1998**, 261, 139.
- 124 J. Benkhoff, R. Boese, F.-G. Klärner, *Liebigs Ann./Recl.* **1997**, 501.
- 125 J. Panitzky, *Dissertation*, Universität Essen **2001**.

- 126 B. Atasoy, F. Bayramoglu, T. Hökelek, *Tetrahedron* **1994**, 50, 5753.
- 127 D. N. Butler, R. A. Snow, *Can. J. Chem.* **1975**, 53, 256.
- 128 R. Hobza, H. L. Selze, E. W. Schlag, *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 3937.
- 129 R. Hobza, H. L. Selze, E. W. Schlag, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 3500.
- 130 T. Gersthagen, *Dissertation*, Universität Duisburg-Essen **2011**.
- 131 M. Andersson, S. Oscarson, L. Öhlberg, *Glycoconjugate Journal* **1993**, 10, 461.
- 132 U. Westerlind, J. Westman, E. Törnquist, C. I. E. Smith, S. Oscarson, et al., *Glycoconjugate Journal* **2004**, 21, 227.
- 133 A. E. Wigger, *Dissertation*, GH Universität Essen **1998**.
- 134 S. Eustermann, H. Videler, J.-C. Yang, P. T. Cole, D. Gruszka, D. Veprintsev, D. Neuhaus, *J. Mol. Biol.* **2011**, 407, 149.
- 135 K. S. Putt, P. J. Hergenrother, *Analytical Biochemistry* **1997**, 249, 106.
- 136 C. A. Nottbohm, R. S. Dothager, K. S. Putt, M. T. Hoyt, P. J. Hergenrother, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 2112.
- 137 C. Cosi, K. Guerin, M. Marin, W. Koek, K. Rollet, *Brain Research* **2004**, 996, 1.
- 138 F. D. King, G. Lawton, A. W. Oxford, *Progress in Medicinal Chemistry* **2004**, 42.
- 139 *OriginLab 8.6G*, OriginLab Corporation, USA.
- 140 J. Ahlers, A. Arnold, Fr. R. von Döhren, H. W. Peter, *Enzymkinetik*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, **1982**.
- 141 M. Dixon, E. C. Webb, *Enzymes*, 7rd ed., Academic Press, New York, **1958**.
- 142 H. U. Bergmeyer, J. Bergmeyer, M. Grassl, *Methods of Enzymatic Analysis* Vol. II, 3rd ed., Verlag Chemie, Weinheim, **1983**.
- 143 K. B. Taylor, *Enzyme Kinetics and Mechanisms, Chapter 6: Effects of Analog Inhibitors*, Kluwer Academics Publishers, Dodrecht, the Netherlands, **2002**.
- 144 S. Chattopadhyay, B. Das, C. Dasgupta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 8284.
- 145 D. Nelson, M. Cox, *Lehninger Biochemie*, 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **2001**.
- 146 G. Löffler, P. E. Petrides, *Biochemie und Pathobiochemie*, 7. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **2003**.
- 147 N. Price, B. Hames, D. Rickwood, *Proteins LabFax Academic Press* **1996**.
- 148 R. Bäumer, A. Maiwald, *Onkologische Pflege*, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, **2008**.
- 149 M. Campaña Kuchenbrandt, *Dissertation*, Universität Duisburg-Essen **2007**.
- 150 Molecular Probes, *Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) Kit* **2007**.

151 *TableCurve2D*, Systat Software GmbH, USA.

152 *SigmaPlot 10.0*, Systat Software GmbH, USA.

153 *ITC-MicroCal* für *Origin 7.0*, OriginLab Corporation, Northampton, USA.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.